# BIOCHEMISCHE UND ZELLBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR DIFFERENZIERUNG UND SCHICHTENBILDUNG IN DER EMBRYONALEN HÜHNCHENRETINA

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

GÜNTER VOLLMER

aus

Albstadt-Tailfingen

1984

# BIOCHEMISCHE UND ZELLBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR DIFFERENZIERUNG UND SCHICHTENBILDUNG IN DER EMBRYONALEN HÜHNCHENRETINA

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

GÜNTER VOLLMER

aus

Albstadt-Tailfingen

1984

| | |
|---|---|
| Tag der mündlichen Prüfung | 10.05.84 |
| Dekan | Prof. Dr. E. Kulzer |
| (am Tag der mündlichen Prüfung) | |
| 1. Berichterstatter | Prof. Dr. A. Gierer |
| 2. Berichterstatter | Prof. Dr. W. Seyffert |

Gesamtherstellung: **aku**-Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit zwischen April 1981 und April 1984 am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen bei Herrn Prof. Dr. A. Gierer angefertigt. Herrn Prof. Dr. A. Gierer möchte ich an dieser Stelle für einen optimal ausgerüsteten Arbeitsplatz, seine Betreuung und vor allem für seine Diskussionsbereitschaft, die sich sehr fruchtbar auswirkte, sowie seine großzügige Förderung danken.

Herrn Dr. Paul Layer möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen. Seine ausgeprägte Bereitschaft zur Kooperativität, seine Hilfsbereitschaft und manche entscheidenden Diskussionsbeiträge waren besonders wertvoll.

Bei Frau S. Grauer und Frau S. Kotz möchte ich mich für Ihre exzellente technische Hilfe bedanken. Mein Dank gilt weiterhin Herrn G. Hansmann und Herrn A. Schöffski für viele Hinweise im technischen Bereich, sowie Frau A. Tanaka-Ingold für das Schreiben großer Teile dieser Arbeit und der darauß entstandenen Veröffentlichungen.

ABKÜRZUNGEN UND TRIVIALNAHMEN

| | |
|---|---|
| Acetyl-CoA | S-Acetyl Coenzym A |
| AChE | Acetylcholinesterase E.C.3.1.1.7. |
| Amidol | 4-Hydroxy-1,3-phenylendiammoniumdichlorid |
| Ara-C | Cytosin-1-ß-D-arabinofuranosid |
| BrdU | 5-Bromo-2'-Deoxyuridin |
| ChAT | Cholin Acetyltransferase E.C.2.3.1.6. |
| COMT | Catechol-O-Methyltransferase E.C.2.1.1.6. |
| cpm | Impulse pro Minute |
| DAPI | 4,6-Diamidino-2-phenylindol |
| DNase I | Deoxyribonuclease I = 5' Oligonucleotid-hydrolase E.C.3.1.4.5. |
| E | Embryonal |
| Eagle's MEM | Eagle's Minimal Essential Medium |
| EDTA | Äthylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz |
| EGTA | Äthylenglykol-bis-(ß-aminoäthyläther)-N,N'-tetraessigsäure |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorting |
| FITC-PNA | Fluorescein isothiocyanat gekoppeltes Peanut Agglutinin |
| GABA | $\gamma$-Aminobuttersäure |
| GAD | Glutamic Acid Decarboxylase = L-Glutamat-1-Carboxylyase E.C.4.1.1.15. |
| GCL | Ganglion cell layer (Ganglienzellschicht der Retina) |
| HEPES | N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure |
| INL | Inner nuclear layer (innere Körnerschicht der Retina) |

| | |
|---|---|
| IPL | Inner plexiform layer (innere plexiforme Schicht der Retina) |
| Kainic Acid | 2-Carboxyl-3-carboxymethyl-4-isopropanyl-pyrrolidin |
| KOH | Kaliumhydroxyd |
| LY | Lucifer Yellow |
| Muscimol | 5-Aminomethyl-3-hydroxyisoxazol |
| ONL | Outer nuclear layer (äußere Körnerschicht der Retina) |
| OPL | Outer plexiform layer (äußere plexiforme Schicht der Retina) |
| Pargylin Hydrochlorid | N-Methyl-N-2-propinylbenzylamin.Hydrochlorid |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PE | Pigmentepithel |
| PNA | Peanut Agglutinin |
| PPO | 2,5-Diphenyloxazol |
| Protocatechinsäure | 3,4-Dihydroxybenzoesäure |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin |
| TH | Tyrosinhydroxylase = Tyrosin-3 monooxygenase E.C.1.14.16.20 |
| Tris | Tris (hydroxymethyl)-aminomethan |

INHALTSVERZEICHNIS


| | Seite |
|---|---|
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN | 7 |
| 2.1. Einzelzellräparation | 7 |
| 2.2. Reaggregation embryonaler Retinazellen | 8 |
| 2.2.1. Schüttelaggregate | 8 |
| 2.2.2. Stationäre Zellkulturen auf Polylysin als Substrat | 9 |
| 2.3. Histologie | 10 |
| 2.3.1. Aggregate | 10 |
| 2.3.2. Augen | 10 |
| 2.4. Färbungen und Markierungen | 11 |

2.5. Zellhomogenate und Enzymtests 14

2.5.1. Zell- und Gewebshomogenate 14

2.5.2. Bestimmung der Acetylcholinesterase(AChE)-aktivität 15

2.5.3. Bestimmung der Cholinacetyltransferase(ChAT)-aktivität 16

2.5.4. Bestimmung der Tyrosinhydroxylase(TH)-aktivität 16

2.5.5. Bestimmung der Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-aktivität 17

2.5.6. Bestimmung der Glutamatdecarboxylase(GAD)-aktivität 17

2.6. Aufnahme von $^{3}$H-γ-Aminobuttersäure (GABA) 18

3 ERGEBNISSE 19

3.1. Charakterisierung Lucifer Yellow gefärbter Zellen 19

3.1.1. Der zeitliche Ablauf der Färbung mit Lucifer Yellow 19

3.1.2. Der zeiliche Verlauf der Lucifer Yellow-Färbung in Aggregationsexperimenten 20

3.1.3. Experimente zur Charakterisierung von Lucifer Yellow gefärbten Zellen 22

3.1.3.1. Metabolische Beeinflussung der Aufnahme von Lucifer Yellow 24

3.1.3.2. Charakterisierung Lucifer Yellow gefärbter Zellen in der frühen Phase der Entwicklung der Retina 25

3.1.3.3. Charakterisierung der Lucifer Yellow gefärbten Zellen in der späten Phase der Entwicklung der Retina 31

3.2. Reaggregation embryonaler Hühnchenretinazellen: Aussagen über Proliferation, Aussortierung, Differenzierung und Schichtenbildung in Schüttelaggregaten und der Einfluss der Beimengung von Pigmentepithelzellen 42

3.2.1. Proliferation und Zellvermehrung in Aggregaten aus Retinazellen, sowie Mischungen aus Retina- mit Pigmentepithelzellen 42

3.2.2. Histologische Betrachtungen zur Entstehung und Entwicklung von Aggregaten 47

3.2.2.1. Allgemeine Betrachtungen zur Entstehung von Schüttelaggregaten 48

3.2.2.2. Aussortierung und Schichtenbildung in Aggregaten ohne bzw. mit Pigmentepithelzellen im Aggregat 51

3.2.3. Histologie der Aggregate aus Retinazellen des Embryonaltages E6 54

3.2.4. Aggregate aus E5 Retinazellen 63

3.2.5. Aggregate aus Retinazellen aus Stadien nach E6 67

3.3. Einfluß des monoclonalen Antikörpers FC1 auf embryonale Retinaeinzelzellen in stationärer Zellkultur und in Schüttelaggregationsexperimenten 72

3.4. Aggregate aus dissoziierten E6 Tektumzellen 77

4 DISKUSSION 80

4.1. Charakterisierung Lucifer Yellow gefärbter Zellen 80

4.1.1. Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer Yellow in retinale Zellen in Abhängigkeit des Alters des Retinagewebes 80

4.1.2. Zum Aufnahmemechanismus für Lucifer Yellow 81

4.1.3. Charakterisierung Lucifer Yellow gefärbter Zellen in der frühen Entwicklungsphase der embryonalen Retina 83

4.1.4. Charakterisierung von Lucifer Yellow gefärbten E11 - E14 Retinazellen 85

4.2. Reaggregation dissoziierter, embryonaler Hühnchenretinazellen 89

4.2.1. Proliferation und Zellvermehrung in vitro 89

4.2.2. Prozesse, die zur Entstehung, Entwicklung und Differenzierung in Aggregaten aus E6 Retinazellen führen 95

4.2.3. Vergleich der Histologie von Aggregaten nach 14 - 21 Tagen in Schüttelkultur 99

5 ZUSAMMENFASSUNG 102

Lebenslauf

Akademische Lehrer

## 1. EINLEITUNG

Die Entstehung des zentralen Nervensystems ist sehr kompliziert und in vielen Teilaspekten unverstanden. Eine Erleichterung für das Verständnis bietet die Beschränkung auf Untersuchungen der Entwicklung von Teilen des zentralen Nervensystems. So ist das visuelle System des Hühnchens als Teil des zentralen Nervensystems, bestehend aus der Neuroretina und dem optischen Tektum, aus vielen Gründen zum Studium der Prozesse, die zu seiner Entstehung, Reifung und Funktion führen, geeignet. Unter anderem sind das Auge mit der Neuroretina und das optische Tektum des Hühnchens präparativ leicht zugänglich.

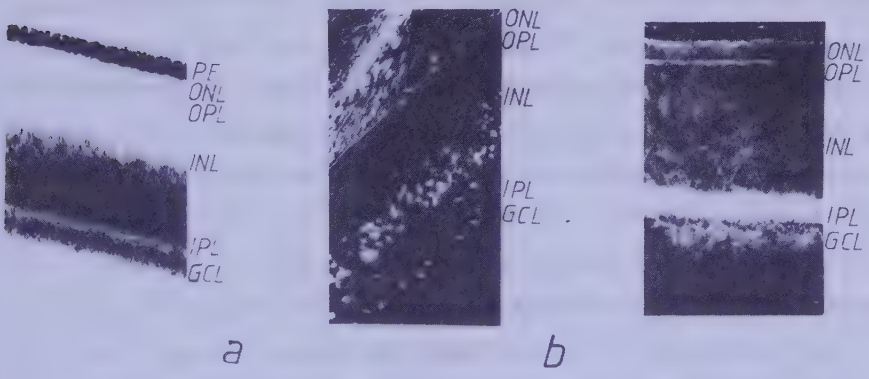



Abb. 1: Abb. 1a zeigt einen Schnitt durch eine E10 Retina, gefärbt mit der histochemischen AChE Reaktion. Die GCL, ein Band in der IPL und Zellen in der inneren Hälfte der INL werden mit dieser Prozedur gefärbt. Abb. 1b zeigt das Färbemuster, das nach der selektiven Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes LY in eine E14 Retina erhalten wird. Gefärbt sind die "displaced" amakrinen Zellen in der GCL und eine Subpopulation von amakrinen Zellen in der inneren Hälfte der INL. Die Färbung eines Schnittes durch eine E12 Retina, die mit FITC-PNA gefärbt wurde, ist in Abb. 1c dargestellt. Die Faserschichten (IPL und OPL), sowie die Grenzschicht zwischen der ONL und dem PE sind gefärbt.

Die sich entwickelnde Neuroretina ist ein relativ einfaches Modellsystem, um die Entwicklung und die räumliche Organisation vielschichtiger Strukturen des Nervensystems zu studieren. Die Retina besitzt eine hochgeordnete Schichtstruktur, bestehend aus Zell- und Faserschichten. Diese Schichtstruktur kann beim Betrachten von histologischen Schnitten durch die Retina erkannt werden, jedoch erleichtert die Färbung mit spezifischen Markern diese Betrachtung. Abb. 1 zeigt drei dieser Marker: Das Enzym Acetylcholinesterase (AChE), das u.a. den Neurotransmitter Acetylcholin selektiv abbaut, kann mit einer histochemischen Reaktion (36,44,63) in der Ganglienzellschicht (GCL), als Band in der inneren plexiformen Schicht (IPL) und in Zellen in der inneren Hälfte der inneren Körnerschicht (INL) sichtbar gemacht werden (Abb. 1a). Durch die Bindung des Lektins Peanut-Agglutinin (PNA) (46), das mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyant (FITC) gekoppelt ist, an Rezeptormoleküle mit endständigen D-Galaktoseresten, werden die Faserschichten (innere (IPL) und äußere (OPL) plexiforme Schicht), sowie die Grenzschicht zwischen der äußeren Körnerschicht (ONL) und dem Pigmentepithel (PE) gefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow (LY) (41,42,43) färbt eine Subpopulation von Zellen in der GCL und in der inneren Hälfte der INL (Abb. 1b). Der Aufnahmemechanismus dieses Farbstoffes und die Zellpopulationen, die diesen Farbstoff im Verlauf der Entwicklung der Retina selektiv aufnehmen, waren nicht charakterisiert. Da zu vermuten ist, daß es sich um funktionell und biochemisch einheitliche Zellen handelt, wurden im 1. Teil dieser Arbeit Untersuchungen zur zellulären und biochemischen Charakterisierung LY gefärbter Zellen durchgeführt.

Eine Methode, die Entwicklung der räumlichen Organisation vielzelliger Organismen, hochgeordneter Organe oder histologisch hochorganisierter Teile des Zentralnervensystems, die aus vielschichtigen Strukturen bestehen, zu studieren, ist deren Dissoziation in Einzelzellen mit nachfolgender Geweberekonstitution durch Schüttelaggregationsexperimente. Mit dieser Methode konnten Wilson (68) und Galtsoff (21) die vollständige Rekonstitution von Schwämmen (Porifera) untersuchen, die sie vorher in Einzelzellen dissoziiert hatten. Gierer et al. (23) konnten Teile des Frischwasser-Coelenteraten Hydra attenuata reaggregieren und normale Tiere aus den Aggregaten regenerieren. Mit Hilfe von Reaggregations- und Regenerationsexperimenten konnten diese Autoren außerdem zeigen, daß die Zusammensetzung des Hydrengewebes und nicht die zelluläre Ausrichtung für die Polarität der Morphogenese verantwortlich ist. G. Giudice (24) schließlich dissoziierte Seegurkenembryos (Paracentrotus lividus und Arbacia lixula) in $Ca^{2+}$-freiem Meerwasser und erhielt nach Reaggregation intakte Larven.

Mit Reaggregationsexperimenten dissoziierter Einzelzellen wurde nicht nur die Histogenese und Morphogenese relativ einfacher Organismen untersucht, sondern auch die Entwicklung von Organen höherer Organismen. So studierte z.B. Moscona (50) die Entstehung von Muskel- und Knorpelgewebe aus dissoziierten Zellen der Flügelanlage des Hühnchens und die Entstehung von Nierentubuli und Nierenvesikel aus Aggregaten der Zellen der Nierenanlage. Er war außerdem in der Lage zu zeigen, daß sich die Zellen der verschiedenen Gewebe in Mischaggregationsexperimenten spezifisch erkennen und aussortieren. Weiss und Taylor (67) dissoziierten

embryonales Nieren-, Leber- und Hautgewebe von Hühnchen und fanden nach Transplantation von Zellpellets dieser Organe auf die Chorioallantoismembran histologisch hoch organisierte Organe mit normalen Relationen und funktionellen Aktivitäten. A. Garcia-Bellido (22) konnte Imaginalscheiben von Drosophila melanogaster dissoziieren, reaggregieren und die autonome Differenzierung der verschiedenen Borstentypen aus den Zellen der Reaggregate studieren. In Kombinationen von Zellen verschiedener Beinscheiben differenzierten die charakteristischen Zelltypen gemäß der Herkunft der Zelle. M. F. Orr (55) dissoziierte die embryonale Ohrenanlagen von Hühnchen zusammen mit dem assoziierten Mesenchym und dem akustischen Ganglion. Nach Reaggregation fand sie sensorische Epithelmembranen, zusammengesetzt aus Haarzellen und Versorgungszellen. DeLong schließlich (11) konnte aus Hippocampuszellen der Maus, die ein Alter von 18,5 Tagen besaßen, große Aggregate erhalten, die ein histogenetisches Muster aufwiesen, das stark an die normale Hippocampusarchitektur einnerte.

Die oben beschriebenen Experimente zeigen, daß niedrige Organismen oder embryonales Gewebe verschiedensten Ursprungs die Fähigkeit besitzt, nach Dissoziation geordnet zu histotypischen Strukturen zu reaggregieren. Auch embryonale Hühnchenretinazellen besitzen die Fähigkeit zu reaggregieren. Der Reaggregationsprozeß der embryonalen Hühnchenretinazellen beginnt während der ersten 15 - 30 Minuten mit der relativ unspezifischen Anlagerung von Zellen aneinander. In einem nächsten Schritt, bis ca. 2h in Kultur, orientieren sich die aneinandergelagerten Zellen gemäß ihrer Polarität. Sofort nach der Ausrichtung wird diese Primärstruktur durch verschiedene Arten von "Junctions" stabilisiert.

In den nächsten 20 - 24 Stunden erfolgt dann eine Anlagerung der Primäraggregate untereinander, womit der Primäraggregationsprozess abgeschlossen ist (3,60,61). Die Bildung von Rosetten, einer Struktur, bei der sich längliche Retinazellen geordnet um ein Lumen herum ausrichten, ist der nächste Schritt der Gewebsrekonstruktion in vitro. Die Struktur und die Bildung von Rosetten sind von Sheffield et al. (62), Fujisawa (19) und Linser et al. (45) eingehend untersucht worden. Die Öffnung von Rosetten führte zur histotypischen Organisation der dissoziierten Retinazellen und zur Ausbildung der retinotypischen Schichtstruktur, wie Fujisawa (18) beobachtete, als er ein Pellet dissoziierter Retinazellen auf die Chorionallantoismembran eines zweiten Eies transferierte und dieses 7 Tage in Kultur hielt.

Dem zweiten Teil dieser Arbeit lag folgender Plan zu Grunde: Die retinotypische Schichtstruktur sollte in Schüttelkultur durch Reaggregation embryonaler, dissoziierter Hühnchenretinazellen über einen Zeitraum von 14 - 21 Tagen rekonstruiert werden. In histologischen Schnitten der entstandenen Aggregate sollte durch Kombination der oben beschriebenen Markierungsprozeduren der Grad der Ordnung der in Schüttelaggregaten gebildeten Schichtstruktur und damit die Fähigkeit des dissoziierten retinalen Gewebes zur Reorganisation bestimmt werden. Durch Beimengung von PE-Zellen zu Beginn des Reaggregationsexperimentes sollte in einer weiteren Serie von Experimenten ein Teil der natürlichen Umgebung embryonaler Hühnchenretinazellen rekonstruiert werden, um durch diese "Orientierungshilfe" für dissoziierte, retinale Zellen eine Schichtung in Aggregaten entsprechend einer Retina in vivo zu erzielen. Die Prozesse, die zur Entstehung und

Entwicklung der Aggregate, bzw. ihrer retinaähnlichen Schichtstruktur führen, wie Proliferation, Aussortierung und Differenzierung *in vitro* sollten untersucht und mit denen für Aggregate retinaler Zellen in Abwesenheit von PE-Zellen verglichen werden. Letztendlich sollte eine mit spezifischen Markern definierte, hochorganisierte, retinaähnliche Schichtstruktur in Schüttelaggregaten erzielt werden, die als Modellsystem zum weiteren Studium der Entwicklung der räumlichen Organisation einer vielschichtigen Teilstruktur des Nervensystems geeignet ist.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

Als Versuchstiere dienten Hühnchenembryos des Alters E5 - E19. Die befruchteten Eier wurden bei 15°C gelagert und nach Bedarf in einem Inkubator bei 38°C und gesättigter Wasserdampfatmosphäre inkubiert.

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Eier entnommen, mit Wescodyne in der Verdünnung 1:100 desinfiziert und die Embryos steril entnommen. Wenn intakte Augen benötigt wurden, wurden diese vorsichtig herauspräpariert und von Bindegewebsbestandteilen befreit. Die Sklera wurde intakt belassen, damit das Auge während der nachfolgenden Färbe- und Fixierungsprozeduren nicht seine Form verlor. Tekta wurden wie folgt gewonnen: Nach vorsichtigem Öffnen der Häute über dem Gehirn wurde das Gehirn freigelegt und die Tekta herausgeschnitten.

Retina und Pigmentepithel (PE) wurden nach dem Öffnen des freipräparierten Auges durch einen Schnitt entlang der optischen Fissur und dem Entfernen des Glaskörpers nacheinander aus dem Auge herausgeschält.

### 2.1. Einzelzellpräparation

Die E4 - E10 Retinae und die Tekta wurden mit 1 mg/ml Trypsin (Difco, Worthington) für 10' bei Raumtemperatur und 10' bei 37°C inkubiert. E11 - E19 Retinae und PE aller Entwicklungs-

stadien wurden in einer Enzymlösung, die ca. 300 Units/ml Hyaluronidase (Böhringer) und 1 mg/ml Collagenase (Böhringer) enthielt, für 10' bei 37 °C vorinkubiert (58). Nach einem Waschschritt in Hank's-Lösung wurden die Gewebe 10' bei Raumtemperatur und 10' bei 37°C mit 1 mg/ml Trypsin verdaut. Nach einer Zentrifugation 5' bei 800g wurde das anverdaute Gewebe in Gegenwart von 0,05 mg/ml DN'ase I mit einer Pasteurpipette vorsichtig zerspritzt. Nach Zentrifugation 5' bei 800g wurden die Einzelzellen dreimal in Hank's-Lösung gewaschen, in Aggregationsmedium (10 % fötales Kälberserum, 2 % Hühnchenserum, 2 mM Glutamin sowie 0,1% Penicillin/Streptomycin und 0,02mg/ml Gentamycin in Eagles MEM) aufgenommen und die Zelldichte für die Experimente eingestellt. Retina- oder Tektumzellkulturen wurden auf Werte zwischen 2,5 x $10^6$ und 5 x $10^6$ Zellen/ml eingestellt. In Mischaggregationsexperimenten wurden zusätzlich 1 x $10^6$ PE-Zellen zugegeben. Bei Sortierungsexperimenten im fluoreszenzaktivierten Zellsortierungsgerät wurde das Retinagewebe an Stelle von 1 mg/ml Trypsin mit 0,3 mg/ml Papain (Böhringer) für 15' bei 37° C verdaut und wie oben beschrieben weiterverfahren.

## 2.2. Reaggregation embryonaler Retinazellen

### 2.2.1. Schüttelaggregate

In Petrischalen, deren Durchmesser 4 cm betrug (Greiner), wurden entweder 2 ml einer Retina- oder einer Tektumzellsuspension gegeben, deren Zelldichte wie oben erwähnt 2,5 - 5 x $10^6$ Zellen/ml betrugen. Im Falle von Retina- und PE-Mischkulturen war die Zelldichte etwa 2,5 x $10^6$ Retinazellen/ml und 0,5 x $10^6$

PE-Zellen/ml. In Experimenten zur Bestimmung der Zellvermehrung in vitro wurde das Experiment mit genau 5 x $10^6$ Retinazellen/ Petrischale gestartet. Die Petrischalen wurden in einem Schüttelinkubator (60 rpm) mit einer 4 % $CO_2$/96 % Luftmischung für 2 - 21 Tage geschüttelt. Längere Inkubationszeiten resultierten in einer Degeneration der Aggregate. Das Medium wurde täglich gewechselt.

2.2.2. Stationäre Zellkulturen auf Polylysin als Substrat

Petrischalen mit einem Durchmesser von 4 cm wurden mit 2 ml einer Lösung, die 0,5 mg/ml Polylysin in Eagle's MEM enthielt, über Nacht bei 37° C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Schalen mit Eagle's MEM wurden 1 x $10^7$ Retinazellen in 2 ml Kulturmedium (10 % fötales Kälberserum, 2 % Hühnchenserum, 2 mM Glutamat, 0,1 % Penicillin/ Streptomycin und 0,02 mg/ml Gentamycin in Eagle's MEM) in die beschichteten Schalen gegeben. Nach verschiedenen Zeiten in Kultur (37°C, 6 % $CO_2$/94 % Luft) wurden mit dem inversen Mikroskop ICM 405 das Anhaften der Zellen an ihr Substrat, ihre Organisation in Rosetten und das Auswachsen von Fasern in der Kulturschale beobachtet. Der Einfluss des monoclonalen Antikörpers FC1, der von B. Imhof zur Verfügung gestellt wurde, auf die oben beschriebenen, in stationärer Zellkultur stattfindenden Prozesse, wurde ebenfalls untersucht. Dieser monoclonale Antikörper wurde in verschiedenen Konzentrationen ins Kulturmedium gegeben.

## 2.3. Histologie

### 2.3.1. Aggregate

Die nach 2 - 21 Tagen entstandenen Aggregate wurden entweder in einer 10 %igen Formalinlösung oder nach der Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow (LY) (siehe unten) in 4 % Paraformaldehyd für 1 h fixiert, danach zweimal mit PBS gewaschen und zweimal in 30 % Sucrose + 1 % Gummi arabicum inkubiert. In diesem Zustand wurden die Aggregate mit dem Gefriermikrotom (Reichert & Jung) im Falle der LY gefärbten Aggregate 10 µm dick und 16 µm dick für alle anderen Färbungen geschnitten.

### 2.3.2. Augen

Die Augen wurden entweder in 10 % Formalin oder nach LY Färbung (s.u.) in 4 % Paraformaldehyd fixiert, bis sie im Fixiermedium schwebten. Zur Einbettung in Acrylamid (9) wurde danach wie folgt verfahren: Die Augen wurden 2 x 5' in PBS gewaschen, 90' in Methanol bei -20°C und über Nacht in absolutem Alkohol bei 0°C inkubiert. Danach wurden die Augen je 20' in 94 %, 90 %, 70 % und 50 % Alkohol gehalten und zuletzt eine halbe Stunde in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Augen 5h in einer Lösung inkubiert, die in 50 ml 17,5 ml 24 %iges Acrylamid, 5 ml PBS, 350 ul 1,92 %iges Bisacrylamid, 27,5 ml bidest. $H_2O$ und 150 µl TEMED enthielt, und in eine Plastikwanne mit 10 ml Acrylamid/Bisacrylamidlösung der obigen Zusammensetzung transferiert. Nach Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat polymerisierte das Gel über

Nacht. Die im Gel einpolymerisierten Augen wurden aus der Wanne entnommen, in 2-Methylbutan in flüssigem Stickstoff eingefroren und 10 µm dick auf dem Gefriermikrotom geschnitten.

2.4. Färbungen und Markierungen

1. Hämalaun/Eosin-Färbung: Als Übersichtsfärbung wurde eine Hämalaun/Eosin-Färbung gewählt.

2. Acetylcholinesterasefärbung: Das Enzym Acetylcholinesterase (AChE) wurde histochemisch auf Schnitten von Augen oder Aggregaten nach der Methode von Karnovski und Roots (36) mit leichten Modifikationen (44) angefärbt. 50 ml des Färbemediums enthielten 50 mg Acetylthiocholinjodid 32,5 ml 0,1 M Tris/Maleatpuffer pH 6,0, 2,5 ml 0,1 M Natriumcitratlösung, 5 ml $H_2O$, 5 ml 30 mM Kupfersulfatlösung und 5 ml 5 mM Kaliumhexacyanoferrat-III-Lösung. Die Sucroseschnitte wurden zunächst für 15' in Tris/Maleatpuffer, pH 6,0, gewaschen. Im Färbemedium wurden die Schnitte für ca. 2 - 4 h bei 37 °C inkubiert und nach der Reaktion in bidest. $H_2O$ gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Objekte entweder in Entellan oder in Glyceringelatine eingedeckt. Um die unspezifischen Cholinesterasen zu erfassen, wurde mit Butyrylthiocholin an Stelle von Acetylthiocholin als Substrat gearbeitet.

3. Lucifer Yellow-Färbung: Die Aggregate oder isolierten Retinae wurden für 30', die Augen für 2h bei 4 °C in einer LY-Lösung gefärbt, die 0,4 mg/ml an LY in Ringer M + 10 mM HEPES + 2,5 mM EGTA war. Für die Färbung war es essentiell,

daß die Färbelösung $Ca^{2+}$-frei war. Nach dem Färben wurde für 2 h in Ringer M + 2,5 mM EGTA + 10 mM HEPES mit 5 Wechseln des Mediums gewaschen und die Aggregate in 4 % Paraformaldehyd fixiert und wie oben beschrieben weiterbehandelt. Nach dem Schneiden wurden die Objekte mit Elvanol, das 1 % p-Phenylendiamin enthielt, eingedeckt.

4. Färbung mit Fluoresceinisothiocyant gekoppeltem Peanut-Agglutinin (FITC-PNA): Nach dem Waschen der Sucroseschnitte der Aggregate in PBS für 15' wurden die Schnitte für 30' mit 50 µg/ml FITC-PNA bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde für 2 h mit PBS mit 5 Wechseln des Mediums gewaschen. Zum Schluß wurde einmal mit bidest. $H_2O$ gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte in Elvanol, das 1 % p-Phenylendiamin enthielt, eingebettet.

5. Markierung mit $^3$H-Thymidin (Amersham): Sollte zu Beginn des Aggregationsexperiments mit $^3$H-Thymidin markiert werden, so wurden pro Ansatz 2 Retinae aseptisch entnommen, in 2 ml Kulturmedium gegeben, mit 30 µCi $^3$H-Thymidin (Amersham) versetzt und 2 h bei 37 °C geschüttelt. Erst nach dem Waschen wurden die Retinae dissoziiert und in Aggregationsmedium, das während der ersten 24 h der Reaggregation 1 mM nicht markiertes Thymidin enthielt, aufgenommen.

Bei der $^3$H-Thymidinmarkierung in späten Stadien der Aggregation wurde wie folgt verfahren: Zu den Aggregaten in 2 ml Aggregationsmedium wurden 30 µCi $^3$H-Thymidin gegeben und 2 h weitergeschüttelt. Anschließend wurden die Aggregate dreimal mit

Eagle's Medium gewaschen und mit Aggregationsmedium, das 1 mM nichtmarkiertes Thymidin enthielt, weitergeschüttelt. Nach 14 bis 21 Tagen in Kultur wurden die Aggregate entnommen, fixiert und geschnitten. In einem dritten Typ von Experimenten wurden die Aggregate mit 30 µCi- $^{3}$H-Thymidin versetzt, für 16h weitergeschüttelt und direkt nach dem Waschen in Eagle's MEM mit 10% Formalin fixiert und geschnitten.

In einigen Experimenten wurde bei LY gefärbten Zellen der prozentuale Anteil $^{3}$H-Thymidin inkorporierender Zellen ermittelt. Dabei wurde wie folgt verfahren: E6 Retinae wurden aseptisch entnommen und 20' bei 37° C mit 30 µCi $^{3}$H-Thymidin inkubiert. Nach 3 Waschschritten in Eagle's MEM und verschieden langen Zeiten in Kultur in Gegenwart von 5 mM nicht markiertem 2-Deoxythymidin wurden die Retinae mit Ringer M + 2,5 mM EGTA + 10 mM HEPES gewaschen und wie oben beschrieben 20' mit LY gefärbt. In einem Gegenexperiment wurden alle Retinae zu Beginn des Experimentes 20', wie oben beschrieben, mit LY gefärbt und nach 3 Waschschritten in Ringer M und verschiedenen Zeitintervallen in Kultur für 20' mit 30 µCi $^{3}$H- Thymidin versetzt. Nach den jeweiligen Markierungsprozeduren wurden die E6 Retinae mit Trypsin dissoziiert, mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, in 0,1 % Tween 80 in PBS aufgenommen und auf gelatinebeschichteten Objektträgern ausgestrichen. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger in bidest. $H_2O$ gewaschen, noch einmal getrocknet und wie folgt weiterbehandelt.

Die Objektträger wurden mit Ilford K2 Photoemulsion (40 % Emulsion/ 60 % $H_2O$) überzogen. Nach 4 - 7 Tagen Exponierung bei

4°C wurden die Autoradiogramme nach Korr (40) mit einem Entwickler, der in 400 ml Lösung 1,8 g Amidol, 7,2 g Natriumsulfit und 0,34 g Kaliumbromid enthielt, entwickelt. Die Auswertung der Experimente wurde mit einem Zeiss ICM 405 Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Für LY wurde ein Filter benutzt, der bei 400 - 440 nm Anregung erlaubte und ab 470 nm Emission zuließ. FITC-Färbung wurde mit der Filterkombination Anregung 450 - 490 nm, Emission 520 - 560 um beobachtet.

In einer anderen Serie von Experimenten wurden intakte Retinae oder Aggregate verschiedenen Alters mit 30 µCi $^{3}$H-Thymidin für 16h inkubiert, anschließend fünfmal gewaschen, wobei der zweite Waschschritt in Gegenwart von 5mM 2-Deoxythymidin erfolgte. Nach Solubilisierung mit 0,3 M KOH für 2h bei 70°C wurden 4x50 µl des Solubilisates mit 10 ml Tritonszintillator, der 30g PPO in 3l Toluol und 1,5l Triton-X-100 enthielt, versetzt und die eingebaute Radioaktivität in einem Beckman LS 6800 Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. Die Bestimmung des Proteingehaltes der Proben erfolgte nach der Methode von Lowry (47) mit Rinderserumalbumin als Standard.

## 2.5. Zellhomogenate und Enzymtests

### 2.5.1. Zell- und Gewebshomogenate

Die Retinae oder die Zellen wurden zunächst in einem Potter-Homogenisator in einem 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4, der 1 mM EDTA und 0,1 % Triton X 100 enthielt, homogenisiert. Nach einer Zentrifugation 30' bei 10000g wurde das Pellet im obigen Puffer

resuspendiert und zerschallt. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 10000g für 30' wurden die Überstände vereinigt, der Proteingehalt nach der Methode von Lowry (47) mit Rinderserumalbumin als Standard bestimmt und anschließend die Messung der Enzymaktivitäten durchgeführt.

2.5.2. Bestimmung der Acetylcholinesterase(AChE)aktivität (69)

Die Bestimmung der AChE-Aktivität, sowie die Bestimmung aller nachfolgend beschriebenen Ezymaktivitäten wurden als Mikroenzymtests mit radioaktiven Substraten durchgeführt. Mit dieser Methode wird die höchste Sensitivität erreicht. Außerdem bietet sie den Vorteil mit kleinen Volumina zu arbeiten. Dieser Gesichtspunkt war besonders wichtig, weil bei der Isolierung von Zellen mit der FACS-Methode nur kleinste Mengen an Zellhomogenaten erhalten wurden.

Die Bestimmung der AChE-Aktivität wurde wie folgt durchgeführt: In Eppendorfgefäße wurden 10 - 40 µl Homogenat gegeben und mit Extraktionsmedium auf 40 µl aufgefüllt. Zu diesen Proben wurde 10 µl Inkubationsmedium gegeben, das 1 M Natriumchlorid, 0,5 % Triton x 100 und 14 mM an Acetylcholinchlorid enthielt. Zusätzlich wurden in 5 ml Inkubationsmedium 50 µCi 14-C-Acetylcholinchlorid (Amersham), markiert im Acetatrest, zugegeben. Die Inkubation erfolgte 5' bei 37 °C. Danach wurde die Probe im Eisbad mit 1 ml eiskaltem bidest. $H_2O$ verdünnt und über den Ionenaustauscher Dowex 50 W-X8 ($H^+$-form 100-200 mesh) aufgetrennt. Das Harz wurde mit 1 ml eiskaltem bidest. $H_2O$ nachgespült. 2 ml Eluat wurden mit 20 ml Szintillator versetzt, und es wurde die Radioaktivität bestimmt.

2.5.3. Bestimmung der Cholinacetyltransferase(ChAT)-aktivität (69)

9 Teile Zell- oder Gewebsextrakt wurden mit 1 Teil eines Mediums versetzt, das 1 M an Natriumchlorid und 2,5 % an Triton-X-100 enthielt. 10 - 40 µl dieses behandelten Extraktes wurden mit einem Medium, das aus 0,2 M an NaCl und 0,5 % an Triton-X-100 bestand, auf 40 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde mit 10 ul Inkubationsmedium (bestehend aus 1,05 mM Acetyl-CoA und 10 µCi 1-$^{14}$C-Acetyl-CoA (Amersham), 10 mM Cholinjodid und 0,5 mM Physiostigmin in 2 ml Puffer der Zusammensetzung 0,2 M Natriumchlorid und 0,5 % Triton) gestartet. Die Inkubation erfolgte 20' bei 37 °C. Danach wurde mit 1ml eiskalten bidest. $H_2O$ verdünnt, auf den Anionenaustauscher Bio-Rad AG1X8 aufgetragen und aufgetrennt. Das Austauscherharz wurde mit 1 ml bidest. $H_2O$ gespült, die 2 ml Eluat mit 20 ml Tritonszintillator versetzt und die Radioaktivität bestimmt.

2.5.4. Bestimmung der Tyrosinhydroxylase(TH)-aktivität (52)

Die Bestimmung der TH erfolgte wie folgt: Zu 190 µl Inkubationsmedium (240 mM Acetatpuffer pH 6,2, 1,2 mM Eisen-II-sulfat, 48 mM Mercaptoäthanol, 2,4 mM Tyrosin, 0,12 mM Pargylinhydrochlorid und 250 µCi 3,5-$^{3}$H-Tyrosin (Amersham) in 100 ml Inkubationsmedium) wurden 10 µl einer 50 mM Biopterin und 10 µl einer 50 mM Folsäurelösung sowie 10 - 40 µl Extrakt gegeben. Mit Extraktionsmedium wurde auf 250 µl aufgefüllt.

Die Inkubation erfolgte 10' bei 37 °C. Anschließend wurde die Reaktion mit 250 µl 10 %iger Trichloressigsäure (TCA) gestoppt und bei 10000g in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde auf einen Ionenaustauscher Dowex 50 WX 4 aufgetragen, das Pellet mit 0,5 ml eiskalter 5 %iger TCA gewaschen und ebenfalls auf die Säule aufgetragen und aufgetrennt. Die Säule wurde mit 1 ml eiskalten bidest. $H_2O$ gespült, das Eluat mit 20 ml Tritonszintillator versetzt und das bei der Reaktion entstandene tritierte Wasser bestimmt.

2.5.5. Bestimmung der Catechol-O-Methyltransferase(COMT)-aktivität (72)

10 - 40 µl Extrakt wurden mit Extraktionsmedium auf 40 µl aufgefüllt und dazu wurden 10 µl Inkubationsmedium (50 mM Phosphatpuffer pH 6,8, 50 mM Magnesiumchlorid, 12,5 mM Protocatechusäure, 2,75 mM S-Adenosylmethionin und 100 µCi $^3$H-S-Adenosylmethionin in 3 ml Inkubationsmedium) gegeben. Die Inkubation erfolgte 60' bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 µl 1 n HCl gestoppt. Das protonierte Reaktionsprodukt Methylprotocatechusäure wurde mit 5 ml Toluol extrahiert, 4 ml der organischen Phase wurden mit 20 ml Tritonszintillator versetzt und die Radioaktivität wurde bestimmt.

2.5.6. Bestimmung der Glutamatdecarboxylase(GAD)-Aktivität

Zu 10 - 40 µl Homogenat, die mit 10 mM Phosphatpuffer pH 6,8 mit 1 mM EDTA, 2 mM Mercaptoäthanol und 0,1 % Triton-X-100 auf 40 µl aufgefüllt wurden, wurden 10 µl Inkubationsmedium (22,5 mM Pyri-

doxalphosphat, 25 mM Glutamat und 100 µCi G-$^{3}$H-Glutamat (Amersham) in 1,1 ml des oben beschriebenen Phosphatpuffers) gegeben. Die Proben wurden 15' bei 37 °C inkubiert und mit 100 µl 2 n Salzsäure gestoppt. Die 150 ul Reaktionsprodukt wurden auf Dünnschichtplatten mit Konzentrierungszone (Merck) aufgetragen. Am Rand der Platte wurde zur Kontrolle eine Mischung aus Glutamat und GABA laufengelassen, die nach Auftrennung in einem Laufmittel aus Eisessig:Pyridin:Wasser = 1:1:1 mit Ninhydrin angefärbt wurde. Die entstandenen Banden für Glutamat und GABA wurden ausgekratzt und mit 2 M Salzsäure eluiert. 2 ml dieses Eluats wurden mit 20 ml Tritonszintillator versetzt und dessen Radioaktivität wurde bestimmt.

## 2.6. Aufnahme von $^{3}$H-γ-Aminobuttersäure (GABA)

Bei diesem Experiment wurden die Retinae zunächst mit LY gefärbt und nach der Dissoziierung 1 x $10^{6}$ E14-Retinaeinzelzellen in einer Lösung, die 5 µM an GABA mit 10 µCi $^{3}$H-GABA (Amersham) in PBS war, für 10' bei 4° C inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf einen Sucrosegradienten, dessen untere Phase 0,25 M und dessen obere Phase 0,125 M an Sucrose in PBS war, aufgetragen und 5' bei 1000g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgezogen, die Zellen in 4 % Paraformaldehyd fixiert, in PBS gewaschen, in 0,1 % Tween 80 aufgenommen, auf Objektträgern, wie oben beschrieben, ausgestrichen und den autoradiographischen Prozeduren unterworfen.

# 3. ERGEBNISSE

## 3.1. Charakterisierung Lucifer Yellow gefärbter Zellen

### 3.1.1. Der Zeitliche Ablauf der Färbung mit Lucifer Yellow

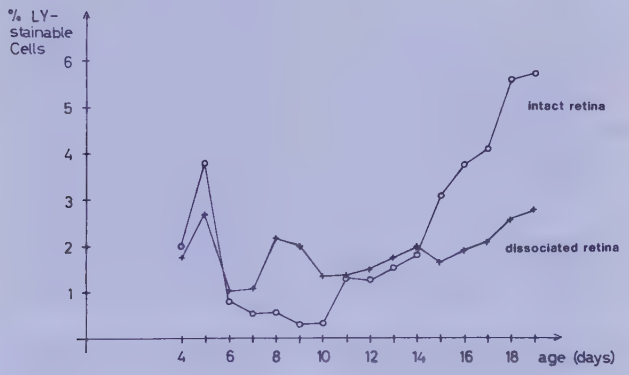



Abb. 2: In Abb. 2 ist der prozentuale Anteil LY anfärbbarer Zellen in Abhängigkeit vom embryonalen Alter der Retina dargestellt. o-o-o-o zeigt die Anzahl LY gefärbter Zellen nach der Färbung von intaktem Retinagewebe, x-x-x-x spiegelt die Anzahl gefärbter Zellen nach der Färbung dissoziierter Retinaeinzelzellen wieder.

In Abb. 2 wird der prozentuale Anteil der mit LY anfärbbaren Zellen in Abhängigkeit vom embryonalen Alter der Retina gezeigt. In einer Serie von Experimenten wurde die intakt entnommene Retina zunächst mit LY gefärbt und anschließend in Einzelzellen dissoziiert. In einer zweiten Serie wurde die Retina zuerst in Einzelzellen dissoziiert und anschließend mit LY gefärbt. Ein erstes Maximum der Färbung tritt am Tag E5 auf. Bei der Färbung von intakten Retinae sinkt der Anteil gefärbter Zellen auf 0,3 %

an den Tagen E9 - E10 ab. Daran schließt sich eine starke Zunahme LY gefärbter Zellen bis auf 6 % zum Zeitpunkt E18 an. Dieser Anstieg repräsentiert das Auftreten gefärbter Zellen in der inneren Hälfte der INL, wie es histologisch in gefärbten Schnitten beobachtet werden kann (43). Wendet man den Farbstoff auf die dissoziierten Einzelzellen an, beobachtet man in der frühen Phase der Entwicklung nahezu identische Werte wie bei der Färbung des intakten Gewebes. Zu späteren Entwicklungsstadien zeigen die beiden Kurven zwei total verschiedene Muster. Die Färbung von Einzelzellen bleibt nach E8 annähernd konstant.

Dieses Ergebnis legt nahe, daß nur während einer frühen Phase der Entwicklung intaktes Gewebe und Einzelzellen den Farbstoff durch verwandte Mechanismen aufnehmen, während in späteren Stadien der Entwicklung ein Gewebe mit intakter Zellstruktur benötigt wird, um ein Färbeverhalten vergleichbar mit histologischen Schnitten zu finden. Kontrollexperimente zeigten, daß nur lebende Zellen gefärbt werden. In einem Trypanblauausschlußexperiment wurde festgestellt, daß nie Zellen auftreten, die gleichzeitig mit Trypanblau und LY anfärbbar waren.

### 3.1.2. Der zeitliche Verlauf der Lucifer Yellow-Färbung in Aggregationsexperimenten

Hält man Aggregate aus E6 Einzelzellen für 2 - 4 Tage in Kulturmedium, so haben sich Strukturen gebildet, die Rosetten genannt werden, und in histologischen Schnitten erkennbar sind: Es handelt sich um längliche Zellen, die einen Hohlraum umschließen. Während dieses Stadiums der Aggregation sind nur wenige Zellen

mit LY anfärbbar. Die gefärbten Zellen in diesem Stadium der Aggregation befinden sich hauptsächlich an der Peripherie der Aggregate, sowie in der Nähe von Rosetten (Abb. 3b). Wird die

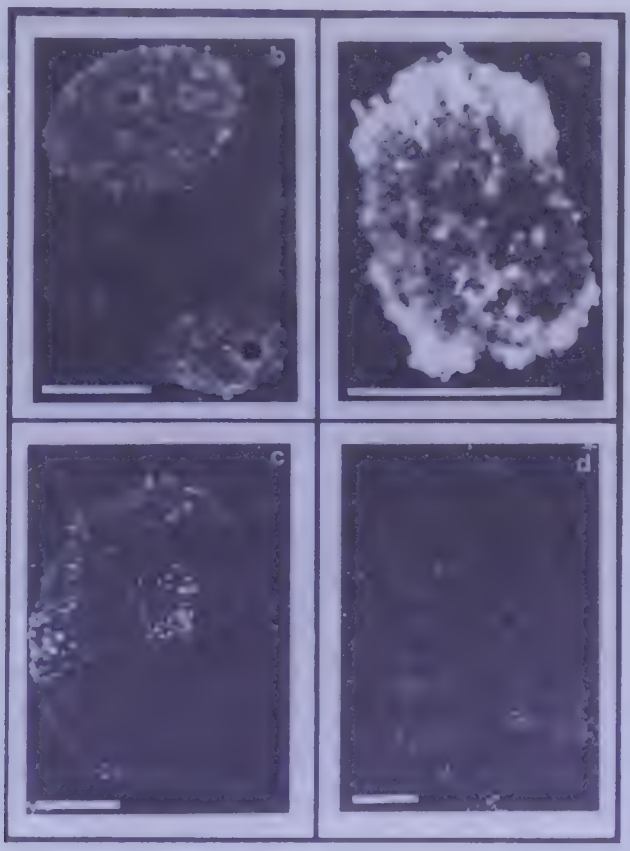



Abb. 3: In Abb. 3a ist ein LY gefärbter Schnitt durch ein Aggregat aus E6 Retinazellen nach 3 Tagen in Kultur, in Abb. 3b nach 4 Tagen in Kultur, in Abb. 3c nach 5 Tagen in Kultur und in Abb. 3d nach 5 Tagen in Kultur, nachdem die Zellen für 21h zu Beginn des Reaggregationsexperimentes mit BrdU behandelt wurden, dargestellt. Bis Tag 4 in Kultur erkennt man LY Färbung in der Nähe der Peripherie der Aggregate und in der Nähe von Rosetten. Ab Tag 5 in Kultur erscheint eine mit LY anfärbbare Zellpopulation im Zentrum der Aggregate. Mit BrdU kann dieses geordnete Auftreten von LY anfärbbaren Zellen verhindert werden (Abb. 3d).

Zelldifferenzierung durch die Anwesenheit von BrdU während der Inkubation gehemmt, sind mehr Zellen gefärbt, auch im Zentrum des Aggregates (Abb. 3d). Ab Tag 5 in Kultur erscheinen auch im Zentrum von Aggregaten gefärbte Zellen (Abb. 3c). Sie sind kreisförmig im Innern des Aggregates angeordnet. In einem vergleichbaren, BrdU behandelten, Aggregat sind LY anfärbbare Zellen immer noch über das ganze Aggregat verteilt (Abb. 3d). Ab Tag 5 in Kultur wird eine Population LY gefärbter Zellen im Innern der Aggregate gefunden. Dies steht im Einklang mit dem Auftreten anfärbbarer Zellen in der inneren Hälfte der INL der Retina in vivo am Embryonaltag 10 1/2 - 11.

### 3.1.3. Experimente zur Charakterisierung von Lucifer Yellow-gefärbten Zellen

Wie aus Abb. 2 zu ersehen ist, gibt es in Abhängigkeit des Alters der Retina zwei Phasen, in welchen LY in Zellen der Retina aufgenommen wird. In einer frühen Phase etwa von E4 - E6 und nach Durchlaufen eines Minimums der Anfärbbarkeit tritt etwa zwischen E11 und E18 eine erneute Zunahme der Anfärbbarkeit auf. Zur Charakterisierung der gefärbten Zellen in den beiden Phasen der Entwicklung der Retina wurden Untersuchungen an E6 und E14 Retinae durchgeführt.

Tabelle 1

| Hemmstoff | Ausgezählte Zellen | Gefärbte Zellen | % gefärbte Zellen |
|---|---|---|---|
| Kontrolle (Pbs (-Ca2+-Mg2+) | 2880 | 59 | 2.05 |
| Natriumazid | 2877 | 59 | 2.05 |
| Kaliumcyanid | 2260 | 45 | 1.99 |
| Dinitrophenol | 2286 | 48 | 2.1 |
| Natriumfluorid | 2394 | 53 | 2.21 |
| Jodacetat | 1954 | 33 | 1.69 |
| Gramicidin | 2523 | 70 | 2.76 |

### 3.1.3.1 Metabolische Beeinflussung der Aufnahme von Lucifer Yellow

In einem ersten Experiment wurde untersucht, ob die Färbung mit LY in irgendeiner Weise vom Energiestoffwechsel der Zelle abhängig ist. Dabei wurde bei E14 Retinae mit Natriumazid und Kaliumcyanid die Atmung gehemmt, mit Dinitrophenol die Atmung von der oxydativen Phosphorilierung entkoppelt und mit Jodacetat und Natriumfluorid die Glykolyse inhibiert. Außerdem wurde der Einfluß des Ionophors Gramicidin getestet. Vor der Färbung wurden die Retinae dem Agens 15' ausgesetzt, das auch noch während des Färbevorganges im Medium belassen wurde. Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, besitzt keiner dieser Hemmstoffe einen signifikanten Einfluß auf das Färbeverhalten der mit LY anfärbbaren Zellen. Einen geringen Effekt weist der Ionophor Gramicidin auf, dieser bewirkt einen leichten Anstieg der Anfärbbarkeit mit LY. Das Ergebnis dieser Versuche zeigt eindeutig, daß kein Zusammenhang zwischen dem Energiestoffwechsel der Zelle und der Aufnahme von LY besteht.

3.1.3.2. Charakterisierung Lucifer Yellow gefärbter Zellen in der frühen Phase der Entwicklung der Retina

Abb. 4: Abb. 4c zeigt einen Schnitt durch eine mit LY gefärbte E6 Retina. Abb. 4a zeigt die Morphologie der zahlenmäßig größeren Population LY gefärbter Zellen. Diese besitzt Fortsätze. Die zahlenmäßig kleinere Population gefärbter Zellen (Abb. 4b) liegt an der vitrealen Seite der Retina und besitzt keine Fortsätze mehr. Die Kalibrierungsbalken in Abb. 4a,b entsprechen 10 µm, der in Abb. 4c 0,1 mm.

Wird in ein Auge am Embryonaltag E6 LY intravitreal injiziiert, so ergibt sich das in Abb. 4c dargestellte Färbemuster. Auffällig ist, daß zwei Populationen gefärbter Zellen auftreten. Diese unterscheiden sich einerseits in ihrer Morphologie (Abb. 4a,b) und in ihrer Lage in der Retina. Die zahlenmäßig kleinere Subpopulation besitzt keine Fortsätze und ist an der vitrealen

Seite der Retina lokalisiert (Abb. 4b). Die größere Anzahl der gefärbten Zellen besitzt Fortsätze, mit welchen sie an der Matrixseite der Retina angeheftet ist. Die Zellkörper dieser Zellen liegen etwa ein Drittel von der vitrealen Seite der Retina entfernt. Diese Verankerung ist eine charakteristische Eigenschaft proliferierender Zellen, und die Lage ist mit dem Zellzyklus korreliert (34). Daher wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Zellzyklusphase der Zellen und dem Moment der Aufnahme des Farbstoffes besteht.

Bei diesen Studien wurden zwei Serien von Experimenten durchgeführt (siehe Schema 1). In der ersten Serie wurden alle E6 Retinae zu Beginn des Experimentes mit $^{3}$H-Thymidin markiert und zu verschiedenen Zeiten danach mit LY gefärbt. In der zweiten Serie wurden zu Beginn des Experimentes alle Retinae mit LY gefärbt und nach verschiedenen Zeitintervallen danach mit $^{3}$H-Thymidin markiert.

Schema 1

| | Serie 1 | Serie 2 |
|---|---|---|
| Präparation: | 8x2 E6 Rretinae | 10x2 E6 Retinae |
| Erste Färbung oder Markierung mit: | 30 µCi $^{3}$H-Thymidin für 20' bei 37°C in Kulturmedium | 0,4 mg/ml LY in Ringer M + 10 mM HEPES + 2,5 mM EGTA für 20' bei 0°C |
| Erster Waschschritt: | 3x mit Eagle's MEM | 3x mit Ringer M +10 mM HEPES + 2,5 mM EGTA |
| Start des Experimentes (= Zeitpunkt 0): | In Kulturmedium + 1 mM 2-Deoxythymidin | In Kulturmedium |
| Nach 0,1,2...h zweite Färbung oder Markierung mit: | 0,4 mg/ml LY in Ringer M + 10 mM HEPES + 2,5 mM EGTA für 20' bei 0°C | 30 µCi $^{3}$H-Thymidin für 20' in Kulturmedium |
| Zweiter Waschschritt: | 3x mit Ringer M + 10 mM HEPES + 2,5 mM EGTA | 3x mit Eagle's MEM |

In beiden Serien von Experimenten wurden die Zellen nach dem zweiten Waschschritt mit Trypsin dissoziiert, mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, in 0,1 % Tween 80 aufgenommen und wie oben beschrieben die autoradiographischen Prozeduren durchgeführt.

Bei der Auswertung des Experiments wurden im Fluoreszenzmikroskop ICM 405 LY gefärbte Zellen gezählt und gleichzeitig der Anteil gefärbter Zellen, die mit Silberkörnern markiert waren, bestimmt. In den Diagrammen wurden % thymidinmarkierte, LY gefärbte Zellen in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen, die zwischen der Gabe der beiden Marker vergangen war.

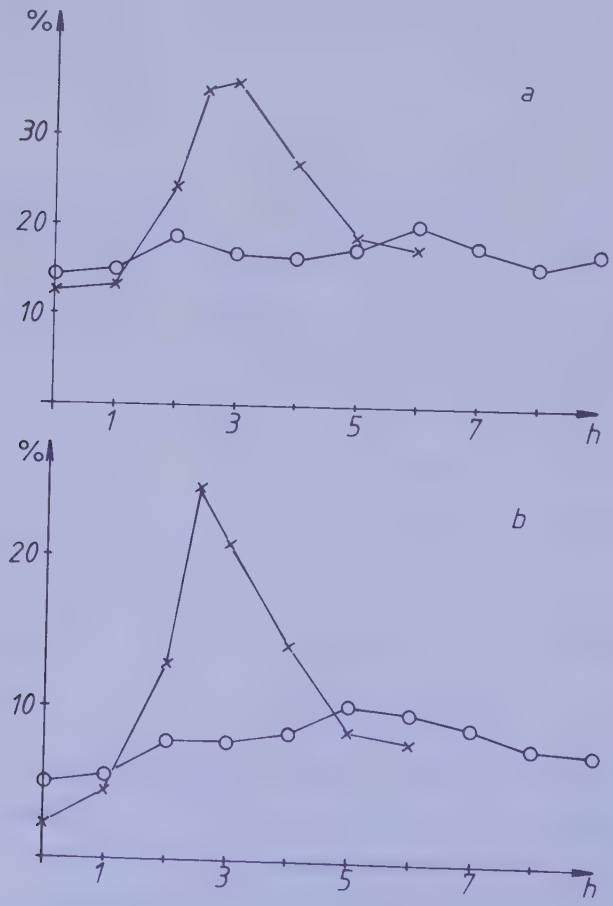


Abb.5: In Abb. 5 ist der prozentuale Anteil LY gefärbter E6 Retinazellen, die mit $^{3}$H-Thymidin markierbar sind, in Abhängigkeit von der zeitlichen Differenz zwischen der Verabreichung der beiden Marker dargestellt. In einem Experiment (x-x-x-x) wurden alle Retinae zur Zeit t=0 mit $^{3}$H-Thymidin, und im Gegenexperiment (o-o-o-o) wurden alle Retinae zu Beginn des Experimentes mit LY gefärbt. Nach den, im Diagramm angegebenen, Zeiten wurde mit dem entsprechenden zweiten Marker gefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop wurden zur Auswertung des Experiments zu jedem Zeitpunkt LY gefärbte Zellen gezählt, der prozentuale Anteil dieser gefärbten Zellen, die gleichzeitig mit $^{3}$H-Thymidin markiert waren, bestimmt und der Anteil (%) doppelt markierter Zellen gegen die zeitliche Differenz der Gabe der beiden Marker aufgetragen (Abb.5a). In Abb. 5b wird nur der Anteil LY gefärbter Zellen, der nach Autoradiographie unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen vollständig mit Silberkörnern bedeckt ist, betrachtet.

Wird zu Beginn des Experimentes mit $^{3}$H-Thymidin markiert, ergibt sich eine Verteilung derjenigen Zellen, die beide Marker tragen, mit einem Maximum von ca. 37 %, wenn 3 h nach der Thymidinmarkierung mit LY gefärbt wurde (Abb. 5a -x-x-x-). 3 h nach der Inkorporierung von $^{3}$H-Thymidin ist also eine Subpopulation von Zellen in der Lage, den Fluoreszenzfarbstoff LY aufzunehmen. Wird jedoch die Retina zunächst mit LY markiert und nach verschiedenen definierten Zeiten ein Thymidinpuls gegeben, so ergibt sich ein annähernd konstanter Wert von etwa 18 % gefärbter Zellen (Abb. 5a -o-o-o-). Ein ähnlicher Kurvenverlauf mit niedrigeren Absolutwerten und damit eine ähnliche Verteilung der Zellen, die beide Marker tragen, ergibt sich, wenn man nur solche Zellen zählt, die unter den oben beschriebenen Bedingungen nahezu vollständig mit Silberkörnern bedeckt sind (Abb. 5b).

In einem weiteren Experiment wurden E6 Retinae für eine halbe Stunde in Kultur mit Cytosinarabinosid (Ara-C), einem sehr effizienten Hemmstoff des Enzyms DNA-Polymerase, versetzt und danach in Gegenwart von $^{3}$H-Thymidin für 20' inkubiert. Nach dem Wa-

schen wurden die Retinae in Kulturmedium weiterkultiviert, das 1 mM nichtmarkiertes Thymidin enthielt. Nach verschiedenen Zeiten wurden die Retinae mit LY gefärbt und dissoziiert. Unter diesen Bedingungen gab es keine thymidinmarkierten Zellen mehr, aber dennoch trat eine Population LY gefärbter Zellen auf.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß es in der E6 Retina zwei Populationen von Zellen gibt, die in der Lage sind, LY aufzunehmen. Eine Population ist ohne zeitliche Korrelation mit vorangegangener DNS-Synthese in der Lage, diesen Farbstoff aufzunehmen. Eine andere Population nimmt diesen Farbstoff ca. 2 - 4 h nach der Inkorporation von $^{3}$H-Thymidin, also nach der Synthesephase, auf. Der Einbau von Thymidin in LY gefärbte Zellen einige Stunden nach der Färbung ergibt 18 % markierte Zellen, weitgehend unabhängig vom Zeitintervall zwischen Färbung und Markierung. Da die S-Phase 4 h, die Einbauzeit 0,3 h, die Zykluszeit 10 h beträgt, ist der Anteil $^{3}$H-Thymidin markierter Zellen unter den proliferirenden Zellen 43 %. Daß nur 18 % aller LY gefärbten Zellen markiert sind, zeigt, daß der größere Teil der LY gefärbten Zellen postmitotisch wird. Diese Zellpopulation entspricht vermutlich der Population von Zellen, die erst nach der letzten DNS Synthese LY aufnehmen: Die Phase maximaler LY Aufnahme würde dem Übergang aus dem proliferierenden in postmitotischen Zustand entsprechen. Diese Interpretation wird zusätzlich bestärkt durch die Tatsache, daß es trotz der Gabe des DNA-Polymeraseinhibitors Ara-C eine Zellpopulation gibt, die in der Lage ist, den Fluoreszenzfarbstoff LY aufzunehmen. Mit diesem Experiment kann in der embryonalen Hühnchenretina eine Subpopulation von Zellen erfaßt werden, die gerade aus dem Proliferationszyklus ausscheidet.

3.1.3.3. Charakterisierung der Lucifer Yellow gefärbten Zellen in der späten Phase der Entwicklung der Retina

a) Behandeln der Retinae mit toxischen Substanzen

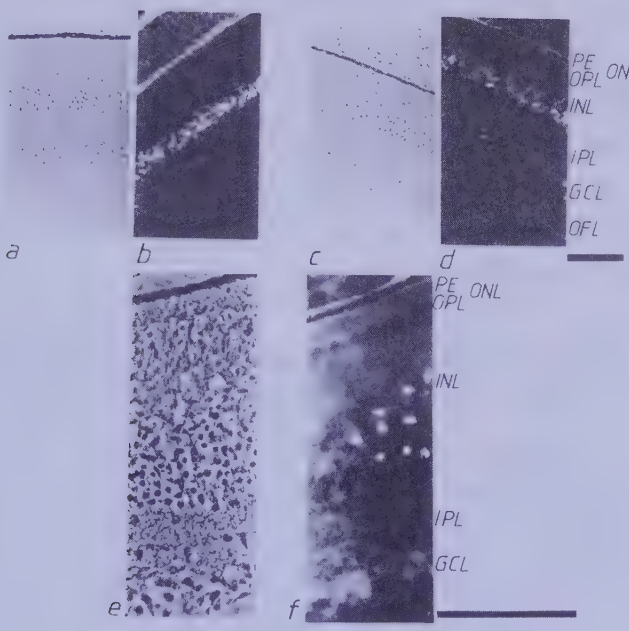



Abb. 6: Abb. 6a,b zeigt das Färbemuster einer E12 Retina mit LY 20 h nach der intravitrealen Injektion von 10 µl PBS. Die innere Hälfte der INL und die "displaced" amakrinen Zellen in der GCL sind gefärbt. In Abb. 6c,d ist eine LY gefärbte E12 Retina 20 h nach der intravitrealen Injektion von 10 ul 20 mM α-Aminoadipinsäure dargestellt. Das Färbemuster ist identisch mit der Kontrolle nach der intravitrealen Injektion von PBS. 20 h nach der intravitrealen Injektion von 10 µl 6 mM Kainic Acid sind in der INL der Retina Löcher entstanden (Abb. 6e). Die Anzahl LY gefärbter Zellen in der INL ist drastisch reduziert, und die "displaced" amakrinen Zellen in der GCL sind verschwunden (Abb. 6f).

Wird Kainic Acid intravitreal gespritzt, so reagieren verschiedene Zelltypen in der Vogelretina mit unterschiedlicher Empfindlichkeit. Bei Gegenwart von 40 nMol Kainic Acid werden die meisten amakrinen Zellen und zwei Drittel der bipolaren Zellen zerstört. Bei der Injektion von 120 nMol Kainic Acid werden zusätzlich horizontale Zellen zerstört. Hingegen überleben Müllerzellen, Ganglienzellen und Photorezeptoren eine Dosis von mehr als 600 nMol Kainic Acid (15,16,32). Hohe Dosen von L-Glutamat bzw. dem Glutamatanologen $\alpha$-Aminoadipinsäure wirken toxisch auf Gliazellen (7,57) und zerstören in der Retina deswegen vorwiegend Müller-Gliazellen.

Es wurde der Einfluß dieser toxischen Substanzen auf das Färbemuster mit LY studiert. Abb. 6b zeigt das typische Färbemuster, das mit LY erhalten wird. Eine Zellpopulation in der inneren Hälfte der INL ist gefärbt, ferner eine Subpopulation von Zellen, bei denen es sich wegen ihrer Lage in der GCL und ihrer Morphologie um "displaced" amakrine Zellen handelt. Abb. 6a zeigt das zugehörige Phasenkontrastbild. Bei dieser Kontrolle wurde PBS intravitreal gespritzt.

In Abb. 6c,d wird deutlich, daß die intravitreale Injektion von 200 nMol (D, L) $\alpha$-Aminoadipinsäure keinen Einfluß auf das Färbemuster mit LY hat. Sowohl ein breites Band von Färbung in der inneren Hälfte der INL als auch die Färbung der Zellen in der GCL sind zu erkennen. Ein anderes Bild ergibt sich nach der intravitrealen Gabe von 60 nM Kainic Acid. Abb. 6e zeigt, daß sowohl in der INL, als auch in der GCL, Löcher entstanden sind. In der INL sind nur noch wenige Zellen gefärbt, und in der GCL

finden sich keine gefärbten Zellen mehr. Aus diesen Experimenten ist unter Berücksichtigung morphologischer Kriterien zu schliessen, daß mit LY eine Subpopulation amakriner Zellen in der Retina gefärbt wird und daß "displaced" amakrine Zellen in der GCL durch diesen Farbstoff gefärbt werden. Mit dieser Färbetechnik war es möglich, den prozentualen Anteil "displaced" amakriner Zellen in der GCL während der embryonalen Entwicklung zu ermitteln.

Tabelle 2

| Alter | Gezählte Anzahl von Zellen in der Ganglienzellschicht = 100 % | Anzahl von "displaced amacrine cells" (= % der totalen Zellz.) |
|---|---|---|
| E12,5 | 4120 | 921 (22,3) |
| E15 | 5807 | 1366 (23,6) |
| E18 | 1307 | 320 (24,4) |

Der Prozentsatz gefärbter Zellen unter allen Zellen in der GCL liegt um 23 % zwischen den Embryonaltagen 12 und 18. Für die adulte Hühnchenretina haben Ehrlich und Morgan 30 - 35 % "displaced" amakrine Zellen gefunden. Der Grund für dieses Anwachsen ist vermutlich eher im Zelltod der Ganglienzellen, der nach dem Embryonaltag 12 einsetzt (30), zu suchen, als in einer späten Zunahme "displaced" amakriner Zellen.

b) Isolierung der LY-gefärbten Zellen durch fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Bei der Isolierung LY markierter Zellen durch FACS traten drei Probleme auf. Erstens ist die Färbung mit LY in ihrer Intensität uneinheitlich, das heißt, es ergibt sich kein scharfer Gipfel der Verteilung von Zellen um eine bestimmte Fluoreszenzintensität, sondern eine Verteilung über einen weiten Intensitätsbereich. Aus diesem Grunde konnte nicht der Anteil der fluoreszenten Zellen abgetrennt werden, der auf einem Bild, Fluoreszenzintensität gegen Gesamtzellzahl, als Peak erscheinen würde (Abb. 7a,b). Bei präparativen Läufen wurde ausschließlich mit E14 Retinazellen gearbeitet. In diesem Alter sind etwa 2 % der Zellen fluoreszent. Um Kontamination mit nichtfluoreszierenden Zellen zu vermeiden, wurden nur die Zellen mit der höchsten Fluoreszenzintensität abgelenkt. Die Gesamtzellzahl wurde über die Lichtstreuung ermittelt.

Das zweite Problem bestand darin, daß die vorhandene Laserröhre keine optimale Anregungslinie für LY besitzt. Die verfügbaren Hauptlaserlinien waren bei 350,7 nm, 351,1 nm, 356,4 nm, 363,8 nm und 476,5 nm; die Anregungsmaxima für LY liegen bei 280 nm und 430 nm. Deshalb wurde eine Nebenlinie des Lasers bei 454,5 nm ausgewählt, die etwa 20 % der Energie der Hauptlaserlinien besitzt. Dort ist LY noch halb so gut anregbar wie bei 430 nm (65). Dieser Kompromiß ergab eine zufriedenstellende Fluoreszenzausbeute.

Das dritte Problem war die Eigenschaft embryonaler Hühnchenretinazellen, sehr schnell zu reaggregieren. Zwar wurden die dissoziierten Einzelzellen vor dem Auftrennen mit FACS permanent mit einem Magnetrührer gerührt, trotzdem konnte nicht verhindert werden, daß Aggregate, bestehend aus 2 - 4 Zellen, entstanden. Deshalb wurde nie eine hundertprozentig saubere, nur aus LY gefärbten Zellen bestehende, Zellpopulation abgetrennt (s.u.). Die LY gefärbten Zellen wurden lediglich angereichert.

Da es sich bei dem zur Verfügung stehenden Sortiergerät um ein offenes System handelt, gehen im Verlauf der Sortierung durch Turbulenzen, die den Fluß der sehr feinen Strahlen beeinträchtigen, und ähnliche äußere Effekte beträchtliche Mengen an Zellen verloren. Im Durchschnitt wurden 54,3 % der insgesamt abgelenkten Zellen nach Zentrifugation wiedergefunden. Von diesen wiedergefundenen abgelenkten Zellen waren im Durchschnitt 70,6 % der Zellen fluoreszent. Dies entspricht einer etwa 30 fachen Anreicherung der fluoreszenten Zellen verglichen mit der Ausgangspopulation von Zellen.

Abb. 7a zeigt eine Aufnahme Fluoreszenz (x-Achse) gegen Lichtstreuung (y-Achse), also eine Verteilung der fluoreszierenden Zellen über die gesamte retinale Zellpopulation. Abb. 7b stellt die Verteilung der Anzahl von Zellen über die Fluoreszenzintensität (x-Achse) dar. Es zeigt sich, daß eine große Population nichtmarkierter Zellen vorhanden ist, und daß sich für die fluoreszenten Zellen eine kontinuierliche Verteilung und kein Peak bei einer bestimmten Fluoreszenzintensität ergeben. Abb. 7c,d gibt Aufschluß über das Aussehen einer abgetrennten Population

LY gefärbter Zellen. Wie oben beschrieben, entstehen leicht 2 - 4 Zellen große Aggregate (Abb. 7d Pfeil). Diese enthalten auch nichtfluoreszente Zellen, so daß es nicht möglich ist, eine absolut reine Zellpopulation LY gefärbter Zellen zu isolieren, aber es wird eine Anreicherung der Zellen erreicht.

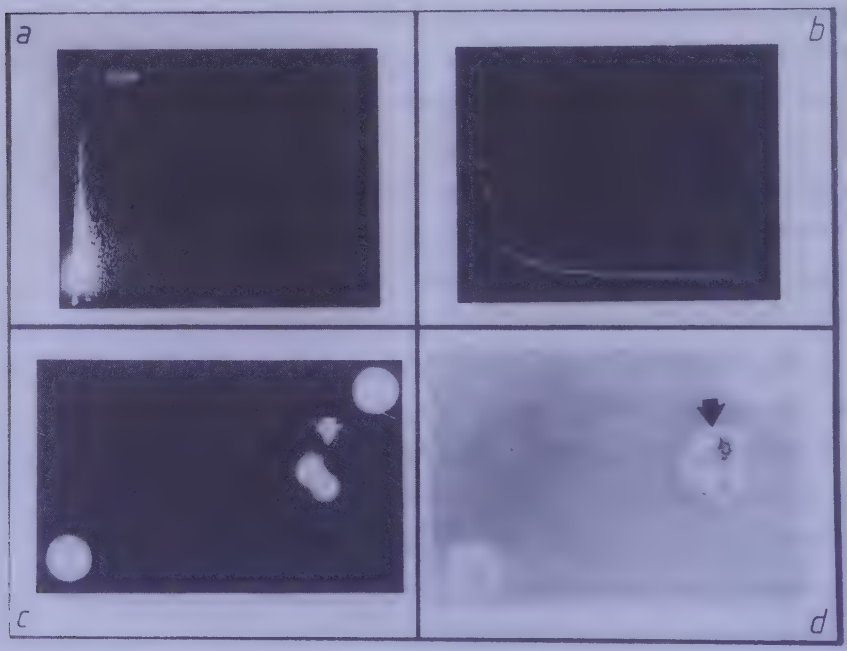



Abb.7: In Abb. 7a ist die Verteilung LY gefärbter E14 Retinazellen (x-Achse) in Abhängigkeit von der Größe und der Anzahl der Gesamtzellpopulation (y-Achse) dargestellt, ermittelt über die Lichtstreuung der Zellen mit FACS. Die überwiegende Mehrzahl der Zellen ist nicht fluoreszent und wird in der Nähe des Koordinatenursprungs abgebildet. Abb. 7b zeigt die Verteilung der Zellen über definierte Fluoreszenzintensitäten, ermittelt mit FACS. Auch hier befindet sich der überwiegende Anteil von Zellen bei der Fluoreszenzintensität 0, dem Koordinatenursprung. Für die fluoreszenten Zellen ergibt sich kein Peak bei einer definierten Fluoreszenzintensität. Auskunft über die Reinheit der mit FACS isolierten fluoreszenten Zellen gibt Abb. 7c,d. Da oft Aggregate aus 2 - 4 Zellen entstanden, die auch nichtfluoreszente Zellen enthielten, konnte nie eine 100 % reine Zellpopulation isolierter fluoreszenter Zellen erhalten werden.

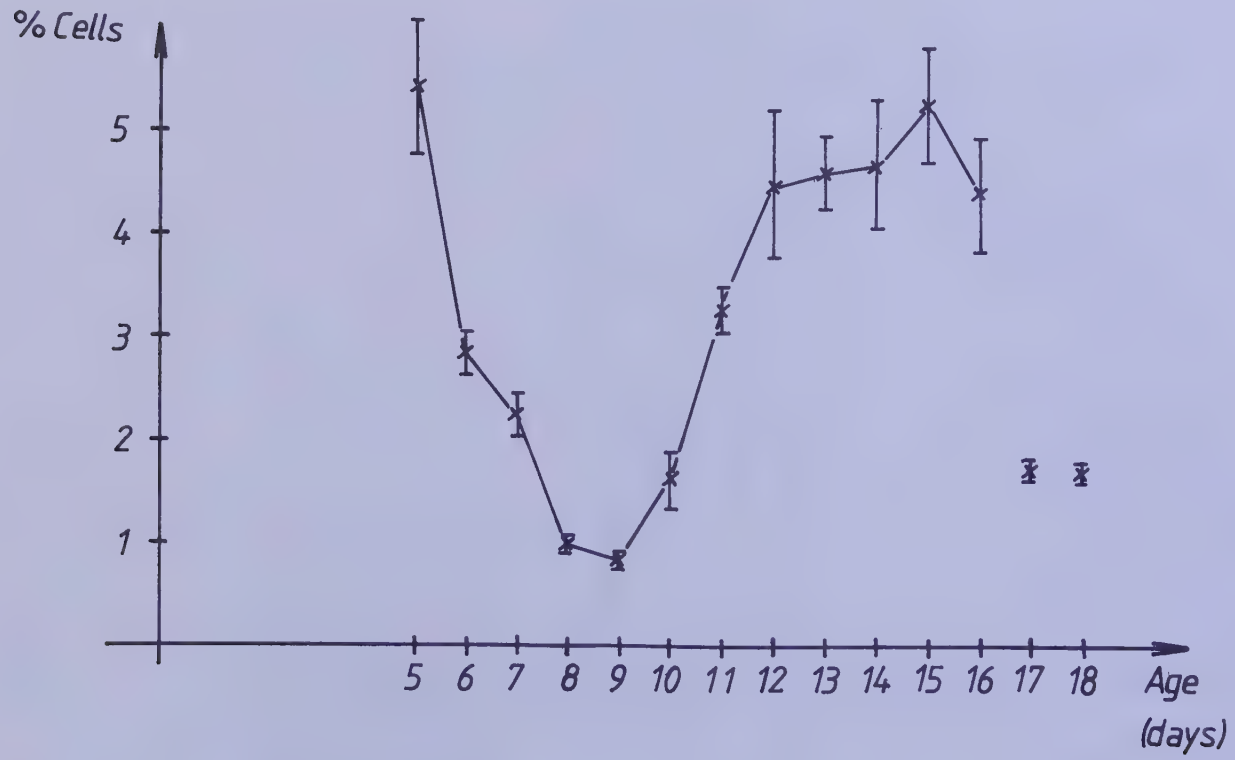



Abb. 8: In diesem Diagramm ist der prozentuale Anteil LY gefärbter Zellen einer intakten Retina in Abhängigkeit vom Alter des retinalen Gewebes, ermittelt mit der FACS-Methode, entsprechend Abb. 2 dargestellt.

Die Anfärbbarkeit retinaler Zellen mit LY in Abhängigkeit des Alters der embryonalen Retina wurde mit FACS ermittelt. Die Werte ergeben einen ähnlichen Kurvenverlauf (Abb. 8), wie man ihn erhält, wenn man eine intakte Retina färbt, dissoziiert und deren Zellen am Fluoreszenzmikroskop auszählt (Abb. 2). Quantitativ sind die einzelnen Werte, die mit FACS ermittelt wurden, höher; dies ist mit der größeren Sensitivität dieser Methode zu erklären. Die relativ niedrige Anzahl fluoreszenter Zellen für die Tage E16 - E18, die mit der FACS Methode erhalten werden, hat vermutlich präparative Gründe: Für eine Trennung mit FACS müssen die Zellen total vereinzelt werden. Beim Auszählen im Lichtmikroskop wurde auf diese drastische Dissoziation verzichtet. Bei der Bestimmung des Anteils fluoreszenter Zellen mit dem Mikroskop befanden sich auch nicht vollständig dissoziierte Gewebsklumpen auf dem Objektträger, die ausgezählt wurden. Für die Trennung mit FACS wurden die Retinae, älter als E15 zur, vollständigen Dissoziierung sehr lange in einer Pasteurpipette zerspritzt. Es ist deshalb möglich, daß ein Teil der Zellen während dieser drastischen Prozedur zerstört wurde und dadurch die Ergebnisse zu niedrig erscheinen.

Tabelle 3

| Enzym | LY-Extrakt | Zellextrakt | Extrakt aus nicht fluoreszenten Zellen |
|---|---|---|---|
| | nMol/mg x min | nMol/mg x min | nMol/mg x min |
| Acetylcholin-esterase | 2,57[2] | 15,6[2] | 4,98[1] |
| Cholinacetyl-transferase | 0,006[2] | 0,044[2] | 0,044[2] |
| Glutamat-decarboxylase | 0,224[3] | 0,203[3] | 0,089[2] |
| Tyrosin-hydroxylase | - | 0,93 | - |
| Catachol-O-Methyl-transferase | - | 0,008 | - |

1 = 2-fache Bestimmungen, 2 = 3-fache Bestimmungen, 3 = 6-fache Bestimmung

c) Acetylcholinesterase-, Cholinacetyltransferase-, Glutamatdecarboxylase-, Tyrosinhydroxylase- und Catechol-O-Methyltransferase-Assay mit isolierten LY-gefärbten Zellen

Mit FACS isolierte, LY gefärbte E14 Zellen wurden homogenisiert und die Aktivitäten der Enzyme AChE, ChAT, GAD, TH und COMT bestimmt. Zu diesem Zwecke wurden E14 Retinae mit LY gefärbt, dissoziiert und mit FACS aufgetrennt. Als Kontrolle wurden zusätzlich ausgetestet: Eine E14 Einzelzellpräparation der gesamten Retina und ein Homogenat der mit FACS als nicht fluoreszent erkannten Zellen. Eine Übersicht über die Ergebnisse liefert Tabelle 3.

Die Ergebnisse zeigen, daß in den LY anfärbbaren Zellen keines der getesteten Enzyme signifikant angereichert ist. TH und COMT sind in Extrakten LY gefärbter Zellen nicht nachweisbar. Die Aktivitäten beider cholinerger Enzyme liegen um den Faktor 6 unter den Aktivitäten einer frisch dissoziierten Gesamtzellpopulation der Retina und die AChE-Aktivität um den Faktor 2 unter einer FACS behandelten Zellpopulation. D.h., daß LY gefärbte Zellen vermutlich keine cholinergen Neurotransmitter benützen. GAD-Aktivität wurde in den Extrakten LY gefärbter Zellen etwa gleich viel gefunden wie im Extrakt einer frisch dissoziierten, nicht mit der FACS-Methode aufgetrennten Retina. Verglichen mit der Aktivität eines Extraktes aus Zellen, die mit der FACS-Methode behandelt, als nicht fluoreszent erkannt und deshalb nicht abgelenkt wurden, ist die GAD-Aktivität in Extrakten LY gefärbter Zellen um einen Faktor 2,5 erhöht. Um die Signifikanz dieses

Experimentes zu überprüfen, wurde ein Versuch zur Aufnahme von tritiertem GABA in E14 Retinaeinzelzellen, die vor der Dissoziierung mit LY gefärbt wurden, durchgeführt. Das Ergebnis ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4

| LY gefärbte Zellen (%) | $^3$H-GABA-markierte Zellen (%) | $^3$H-GABA-markierte LY-gefärbte Zellen(%) |
|---|---|---|
| 1,23 | 10,6 | 22,7 |

Die Tabelle 4 läßt zwei Aussagen zu: Knapp ein Viertel der LY gefärbten Zellen ist in der Lage, GABA selektiv aufzunehmen. Die Menge der GABA akkumulierenden Zellen ist verglichen mit der Gesamtpopulation retinaler Zellen um den Faktor 2 angereichert.

## 3.2. Reaggregation embryonaler Hühnchenretinazellen: Aussagen über Proliferation, Aussortierung, Differenzierung und Schichtenbildung in Schüttelaggregaten und der Einfluß der Beimengung von Pigmentepithelzellen

In den folgenden Abschnitten werden Aggregate aus Retinazellen als R-Aggregate und Aggregate aus Mischungen von Retina- und Pigmentepithelzellen als RPE-Aggregate bezeichnet.

### 3.2.1. Proliferation und Zellvermehrung in Aggregaten aus Retinazellen sowie aus Mischungen von Retina- mit Pigmentepithelzellen

Nachfolgend werden Experimente beschrieben, durch Aggregation von dissoziierten Zellen der Retina histotypische Strukturen zu erhalten. Solche Strukturen beruhen sowohl auf einer Aussortierung verschiedener Zelltypen, die das Aggregat bilden, als auch auf der Bildung und Differenzierung neuer Zellen nach der Aggregation. Diese Neubildung von Zellen findet im großem Umfang statt. Um diese Proliferationsaktivität in vitro zu ermitteln, wurden zwei Arten von Experimenten durchgeführt: a) Die Reaggregation wurde mit einer definierten Anzahl retinaler Zellen pro Kulturschale gestartet. Nach definierten Zeiten wurden die entstandenen Aggregate einer Kulturschale entnommen, wie oben beschrieben mit Trypsin dissoziiert und die Anzahl retinaler Zellen pro Kulturschale bestimmt. b) In je eine Kulturschale wurde im Abstand von 24 h für 16 h 30 µCi $^{3}$H-Thymidin gegeben. Die Aggregate wurden anschließend entnommen, 5x mit PBS gewaschen

(der zweite Waschschritt erfolgte für 15 Minuten in der Gegenwart von 5 mM 2'-Deoxythymidin) und mit 0,5 ml 0,3 M KOH bei 70°C für 2 h solubilisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (10000g für 5') wurden 4 x 50 µl des Überstandes mit 10 ml Tritonszintillator versetzt und die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationsgerät (Beckman) bestimmt. Aus dem Rest des Überstandes wurde der Proteingehalt nach Lowry bestimmt.

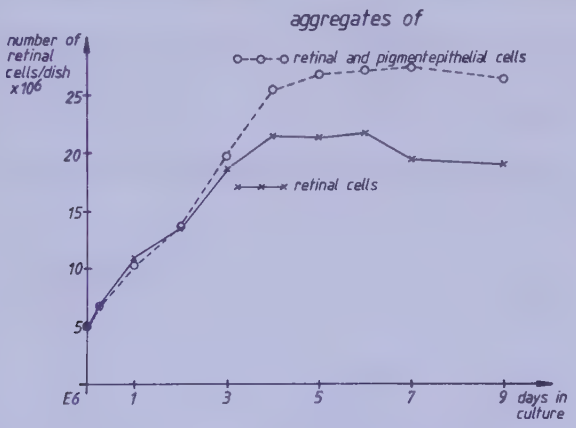
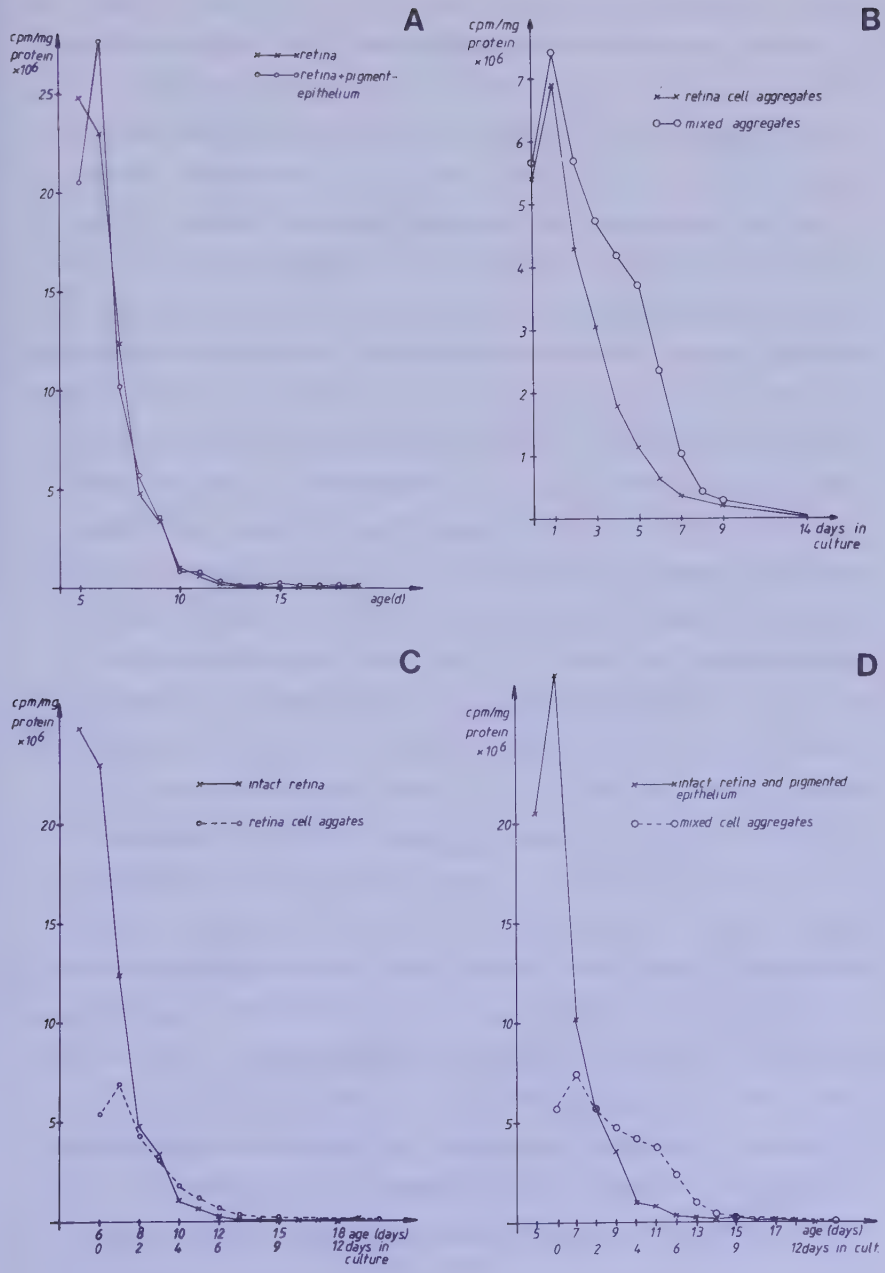



Abb. 9 zeigt die Zunahme der Zellzahl in Aggregaten während verschiedener Zeiten in Kultur. Die Experimente wurden mit 5 x $10^6$ E6 Retinazellen oder 5 x $10^6$ Retinazellen und $10^6$ PE-Zellen pro Kulturschale gestartet. Die Aggregate wurden zu den angegebenen Zeiten aus der Kulturschale entnommen, mit Trypsin in Einzelzellen dissoziiert und die Anzahl retinaler Zellen wurde ermittelt. x-x-x-x repräsentiert R-Aggregate, o-o-o-o repräsentiert RPE-Aggregate. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus 4 Experimenten, wobei die Anfangswerte der Kurve häufiger bestimmt wurden.

In Abb. 9 ist die Zunahme der Anzahl der Retinazellen, in Abhängigkeit von der Zeit in Kultur, dargestellt. Beginnend mit einer Zellzahl von 5 x $10^6$ E6 Retinaeinzelzellen pro Kulturschale wurden nach einer Kulturzeit von 9 Tagen ungefähr 2 x $10^7$ Retinazellen pro Kulturschale im Falle von R-Aggregaten ermittelt. Im Falle von RPE-Aggregaten wurden nach 9 Tagen in Kultur etwa 2,5 x $10^7$ Retinazellen pro Kulturschale bestimmt. Dies bedeutet, daß in R-Aggregaten 75 % der Zellen während des Aggregationsvorganges neu entstehen, in RPE-Aggregaten 80 % der Zellen neu synthetisiert werden. In der Kulturschale werden bei R-Aggregaten während 9 Tagen also eine 4 fache, bei RPE-Aggregaten eine 5 fache Vermehrung retinaler Zellen beobachtet.

Abb. 10: Bei den Experimenten, dargestellt in Abb. 10, wurde wie folgt verfahren: Embryonales Retina- oder Retina- und PE-Gewebe der Altersstufen E5 - E19, bzw. R-Aggregate oder RPE-Aggregate, die sich 0 - 14 Tage zur Reaggregation in Schüttelkultur befunden hatten, wurden für 16 h mit $^3$H-Thymidin markiert, gewaschen, in 0,3 M KOH für 2 h solubilisiert, und es wurden die eingebaute Radioaktivität und der Proteingehalt des Solubilisates bestimmt. In Abb. 10A wird der Einbau von $^3$H-Thymidin in intaktes Retinagewebe (x-x-x-x) mit dem Einbau von Radioaktivität in intaktes Retina- und PE-Gewebe verglichen (o-o-o-o). Abb. 10B vergleicht den Einbau von $^3$H-Thymidin in R-Aggregate aus E6-Zellen (x-x-x-x) mit dem Einbau von $^3$H-Thymidin in RPE-Aggregate aus E6 Gewebe. Einen Vergleich der Einbauraten von $^3$H-Thymidin in intaktes Retinagewebe (x-x-x-x) und in R-Aggregate (o-o-o-o) zeigt Abb. 10C. Ein entsprechendes Diagramm, das den Einbau von $^3$H-Thymidin in intaktes Retina- und PE-Gewebe (x-x-x-x) und in RPE-Aggregate aus E6 Zellen (o-o-o-o) zeigt, ist in Abb. 12D dargestellt. Beim Vergleich der Einbauraten in intaktes Gewebe und in Aggregate wurde die embryonale Entwicklungsstufe E6 mit dem Zeitpunkt 0 Tage in Kultur, dem Beginn der Reaggregation, gleichgesetzt.


A
cpm/mg protein ×10⁶
retina
retina+pigment-epithelium
age(d)
B
cpm/mg protein ×10⁶
retina cell aggregates
mixed aggregates
14 days in culture
C
cpm/mg protein ×10⁶
intact retina
retina cell aggates
age (days)
12 days in culture
D
cpm/mg protein ×10⁶
intact retina and pigmented epithelium
mixed cell aggregates
age (days)
12days in cult

In Abb. 10A ist der Einbau von $^{3}$H-Thymidin in intakte Retina- bzw. Retina- und PE-Gewebe verschiedenen Alters dargestellt. In beiden Experimenten ergibt sich ein fast identischer Kurvenverlauf, wenn man sich die cpm/mg Protein in Abhängigkeit des Alters der Retina bzw. der Retina und des PE betrachtet. In Abb. 10C wird der Einbau von $^{3}$H-Thymidin in intakte Retina mit dem Einbau von $^{3}$H-Thymidin in R-Aggregate verglichen. Dabei entspricht der Embryonaltag E6 im Falle der intakten Retina dem Startpunkt des Aggregationsexperimentes. Zu Beginn der Aggregation, also unmittelbar nach der Dissoziierung der Retina, inkorporieren Retinazellen nur 23,5 % der Radioaktivität, die eine intakte Retina in der Lage ist zu inkorporieren. Nach einem Tag in Kultur wird von den R-Aggregaten 56 % der Menge an $^{3}$H-Thymidin aufgenommen, die eine E7 Retina einzubaut. Nach einem weiteren Tag bis zum Ende der Beobachtung, E19 im Falle der intakten Retina, 14 Tage in Kultur im Falle der R-Aggregate, verlaufen die beiden Kurven weitgehend identisch, die Einbaurate in Aggregate ist leicht erhöht gegenüber der in intaktes Retinagewebe. In Abb. 10D werden die Einbauraten von $^{3}$H-Thymidin in intaktes Retina- und PE-Gewebe mit dem Einbau von $^{3}$H-Thymidin in RPE-Aggregate verglichen. Auch hier wird das Entwicklungsstadium E6 in vivo mit dem Beginn des Aggregationsexperimentes gleichgesetzt. Zu diesem Zeitpunkt wird in RPE-Aggregate nur 20 % der Aktivität des vergleichbaren intakten Gewebes eingebaut. Nach einem Tag in Kultur werden in die Aggregate 73 % der Aktivität einer E7 Retina und eines E7 PE eingebaut. Nach einem weiteren Tag sind die Einbauraten identisch. Während danach die Einbaurate in intaktes Gewebe weiterhin abnimmt, bleibt diese im Falle der RPE-Aggregate für weitere 3 Tage auf einer erhöhten

Rate, um dann auf die, mit intaktem Gewebe vergleichbaren, Werte abzusinken. Ein Vergleich der Aufnahme von $^{3}$H-Thymidin in R-Aggregate aus E6 Retinazellen und RPE-Aggregaten ist in Abb. 10B dargestellt. Bei dieser Darstellungsweise werden zu Beginn des Experimentes (0 - 2 Tage in Kultur) und am Ende des Experimentes (9 - 14 Tage in Kultur) eine vergleichbare Einbaurate von $^{3}$H-Thymidin in die verschiedenen Aggregattypen gemessen. Vom 3. - 7. Tag in Kultur sind die Einbauraten in RPE-Aggregate höher. Am stärksten divergieren die beiden Kurven am fünften Kulturtag. Diese Meßergebnisse weisen darauf hin, daß PE-Zellen in Aggregaten die Fähigkeit besitzen, die Proliferation retinaler Zellen zu stimulieren oder aufrechtzuerhalten. Diese Hinweise werden verstärkt durch histologische Befunde. Die Abb. 11 und 12 zeigen in der linken Spalte Schnitte von RPE-Aggregaten, in der rechten Spalte Schnitte von R-Aggregaten. Aus diesen Schnitten ist zu ersehen, daß in RPE-Aggregaten nach 4 - 7 Tagen in Kultur sehr viel mehr Zellen mit Silberkörnern markiert sind als in R-Aggregaten.

### 3.2.2. Histologische Betrachtungen zur Entstehung und Entwicklung von Aggregaten

Für die histologische Betrachtung der Entstehung und Entwicklung von R-Aggregaten sowie RPE-Aggregate aus E6 Zellen und zum Vergleich der beiden Aggregattypen wurde der Einbau von $^{3}$H-Thymidin in proliferierende Zellen und die histochemische AChE Reaktion als Marker für eine differenzierte Zellpopulation gewählt. Wie die durchgeführten Experimente zeigen, können beide Markierungen auf ein Objekt gleichzeitig angewandt werden. Bei der

histochemischen AChE Reaktion präzipitiert ein brauner Kupfer/ Eisenkomplex, der bei der Entwicklung und Fixierung von Autoradiogrammen leicht ausbleicht. Deshalb ist die Anwendung der Doppelmarkierung bei schwachen Cholinesterasefärbungen ungeeignet. In der vorliegenden Arbeit konnte deswegen für die Schnitte der ersten beiden Kulturtage die Autoradiographie und die Cholinesterasefärbung nicht auf demselben Schnitt, sondern auf benachbarten Schnitten durchgeführt werden.

3.2.2.1. Allgemeine Betrachtungen zur Entstehung von Schüttelaggregaten

R-Aggregate variieren schon während ihrer Entstehung beträchtlich in ihrem Durchmesser. Nach 14 - 21 Tagen in Kultur besitzen sie einen Durchmesser zwischen 0,2 und 2,4 mm (s.u.). Im scharfen Kontrast dazu besitzen RPE-Aggregate relativ einheitliche Durchmesser, die nach 14 - 21 Tagen in Kultur zwischen 0,2 und 0,4 mm liegen. Diese Konstanz im Durchmesser wird dadurch hervorgerufen, daß RPE-Aggregate nie fusionieren, während R-Aggregate nach 2 - 3 Tagen in Kultur eine ausgesprochene Tendenz zur Fusion untereinander besitzen. Dies ist ein sehr wesentlicher Unterschied im Aggregationsverhalten von rein retinalen Zellen und gemischten Zellen in Schüttelkultur. Behandelt man die Zellen zu Beginn des Experimentes für 21h mit BrdU, so verlieren sie die Eigenschaft, geordnet zu aggregieren. Sie bilden einen riesigen, flachen Zellhaufen, der keine Ordnung im Aggregat aufweist.

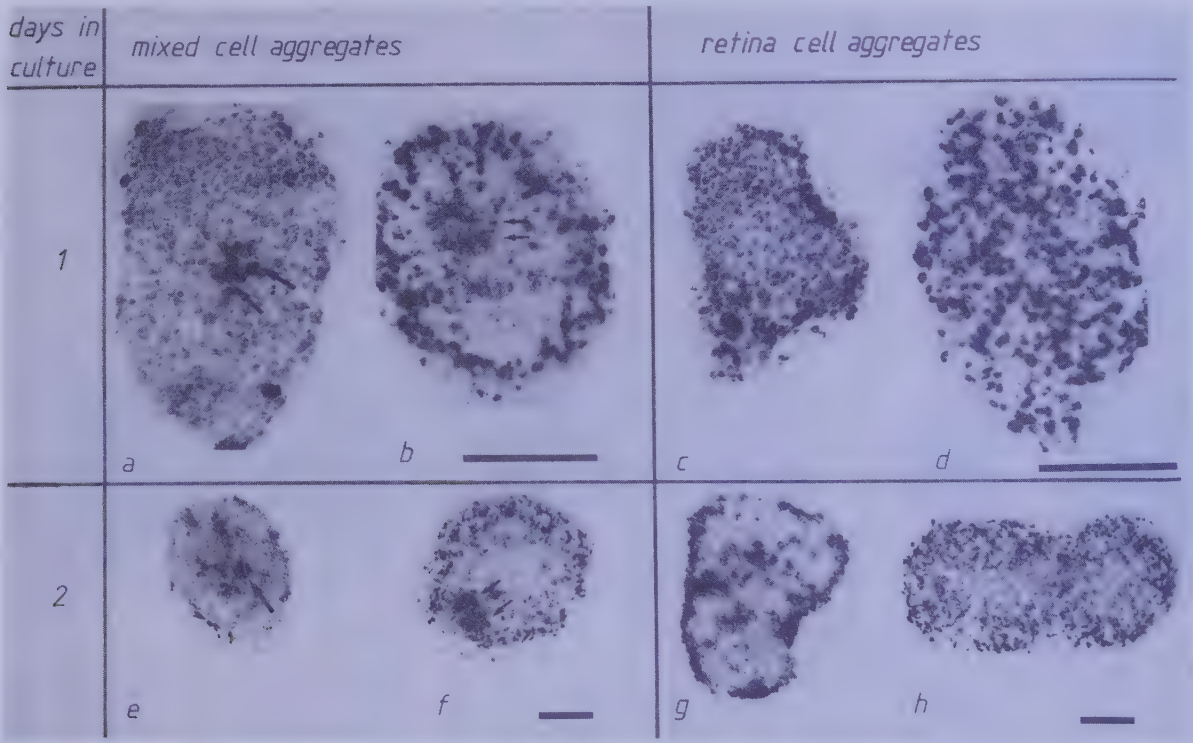



Abb. 11 zeigt die Aggregate, entstanden nach einem Tag (Reihe 1) und zwei Tagen in Kultur (Reihe 2) in Gegenwart von PE-Zellen (mixed cell aggrgates) und in Abwesenheit von PE-Zellen (retina cell aggregates). In Abb. 11a,c,e,g sind die AChE Färbungen dargestellt, in Abb. 11b,d,f,h die Autoradiographien des Einbaus von $^{3}$H-Thymidin. Bei den RPE-Aggregaten sind der PE-Anteil mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet, die AChE Färbung mit weißen Pfeilen. Alle Kalibrierungsbalken entsprechen 0,1 mm.

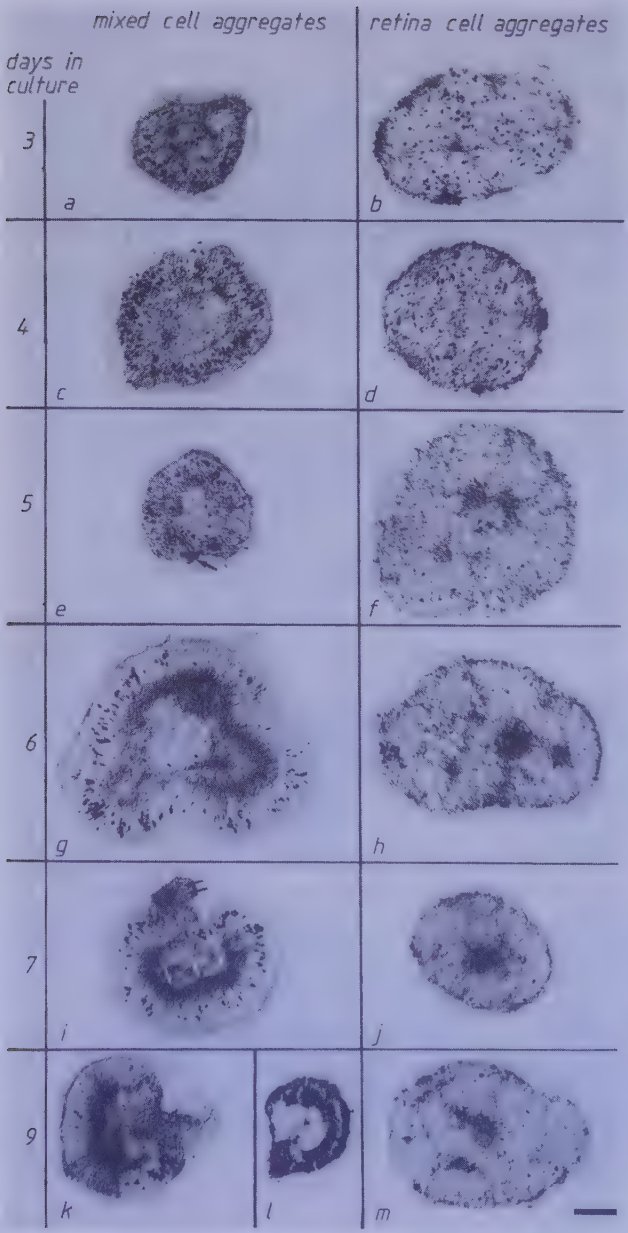



Abb. 12 zeigt die Entwicklung von Aggregaten in Gegenwart von (Spalte mixed cell aggregates) und Abwesenheit von PE (Spalte retina cell aggregates). Der Einbau von $^{3}$H-Thymidin und das Auftreten AChE positiver Zellen wurden als Doppelmarkierung auf einem Objektträger durchgeführt. In den RPE-Aggregaten sind das PE mit schwarzen Pfeilen, die AChE Färbung mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. In Abb. 12l ist ein Schnitt durch einen, aus einem Aggregat ausgeschleusten PE-Klumpen, abgebildet. Der Kalibrierungsbalken entspricht 0,1 mm.

3.2.2.2. Aussortierung und Schichtenbildung in Aggregaten aus Retinazellen ohne bzw. mit Pigmentepithelzellen im Aggregat

Während der ersten beiden Tage in Kultur bildet das PE einen Kern im Zentrum des Aggregates (Abb.11a,b,e,f, schwarze Pfeile). Um das PE herum bildet sich eine hochgeordnete rosettenartige Struktur aus (Abb. 11e, schwarzer Pfeil). Die wenigen AChE gefärbten Zellen befinden sich an der Peripherie der Aggregate (Abb. 11a,e weiße Pfeile). Bei R-Aggregaten sind zu diesem Zeitpunkt mit der AChE Reaktion mehr Zellen anfärbbar. Diese befinden sich an der Peripherie des Aggregates (Abb. 11c,g). Nach einem Tag in Kultur befinden sich die thymidinmarkierten Zellen in den RPE-Aggregaten an der Peripherie der Aggregate. In R-Aggregaten sind die thymidinmarkierten Zellen hingegen über das ganze Aggregat verteilt. Am zweiten Tag in Kultur haben sich in RPE-Aggregaten die thymidinmarkierten Zellen noch deutlicher zur Peripherie des Aggregates hin aussortiert (Abb. 11f), ein geringeres Maß an Aussortierung kann auch in R-Aggregaten beobachtet werden, die jetzt zu fusionieren beginnen.

Ab Tag 3 in Kultur finden in RPE-Aggregaten Prozesse der Proliferation, Sortierung, Anordnung in Schichten und Differenzierung statt:

1. Der PE-Kern wird aus dem Aggregat ausgeschleust und bleibt in einigen Aggregaten an der Peripherie des Aggregates angehaftet (Abb. 12e,i schwarze Pfeile). Ein PE-Klumpen ist in Abb. 12l dargestellt. Sehr vereinzelt tritt der Fall auf, daß der PE-Anteil im Zentrum des Aggregates verbleibt.

2. Das AChE-Produkt tritt nur noch im Zentrum des Aggregates auf (Abb.12 linke Spalte). In vergleichbaren Aggregaten ohne PE tritt zwar ebenfalls AChE Färbung im Zentrum des Aggregates auf, zusätzlich bleibt aber die gefärbte Schicht an der Peripherie des Aggregates vorhanden (Abb. 12 rechte Spalte).

3. Die neu auftretende, AChE positive Schicht in RPE-Aggregaten bildet eine scharfe Kompartimentierungsgrenze im Aggregat. Außerhalb dieser, durch die AChE gefärbte Schicht, gebildeten Grenze, befindet sich im äußeren Drittel des Aggregates der überwiegende Anteil proliferierender Zellen. Innerhalb dieser Grenze befinden sich nur vereinzelt Zellen, die nach Autoradiographie mit $^{3}$H-Thymidin mit Silberkörnern markiert sind (Abb. 12 linke Spalte). In vergleichbaren R-Aggregaten hingegen bleiben die Silber markierten Zellen über das ganze Aggregat verteilt (Abb. 12 rechte Spalte).

4. Innerhalb der "Proliferationszone" gibt es ein geordnetes Ausscheiden der Zellen aus der Proliferation. Am Tag 3 in Kultur sind thymidinmarkierte Zellen über die ganze Zone zwischen der Peripherie des Aggregates und der AChE positiven Schicht verteilt. Mit zunehmender Dauer in Kultur (4 - 7 Tage) nimmt die Proliferation von der Peripherie des Aggregates zu der AChE positiven Schicht hin ab. Es erfolgt also ein gerichtetes, geordnetes Ausscheiden mitotischer Zellen aus dem Proliferationszyklus innerhalb einer Zone im Aggregat (Abb. 12 linke Spalte).

Wie oben schon erwähnt, bleibt die Proliferationsaktivität in RPE-Aggregaten über einen längeren Zeitraum erhalten als in vergleichbaren R-Aggregaten. In den meisten Aggregaten, die an ihrer Peripherie noch einen PE-Klumpen besitzen, ist in unmittelbarer Nachbarschaft des PE die Proliferationsaktivität sehr viel höher als in der restlichen "Proliferationszone" des Aggregates (Abb. 12k).

Auf die Proliferation retinaler Zellen bei Reaggregationsexperimenten üben also während der Aggregation beigefügte PE-Zellen folgende Effekte aus: Die Proliferation wird über einen längeren Zeitraum als in vergleichbaren R-Aggregaten aufrechterhalten. In Aggregaten, deren PE-Anteil am Aggregat haften bleibt, wird in direkter Nachbarschaft zum PE Proliferation induziert oder aufrecht erhalten.

Auf die Ordnung im Aggregat und auf die Ausbildung der Schichtstruktur übt das PE während der Entstehung der Aggregate folgende Effekte aus: Zu Beginn der Aggregation bildet das PE einen Kern im Aggregat, um den herum sich eine Subpopulation retinaler Zellen in einer rosettenartigen Struktur organisiert. Im Verlauf der Aggregation nach 1 - 3 Tagen in Kultur wird der PE-Kern aus dem Aggregat ausgeschleust. Die dem PE benachbarte rosettenartige Schicht trägt nach dem Ausschleusen des PE zur äußersten Schicht des Aggregates bei. Durch das gleichzeitige Auftreten einer AChE positiven Schicht in der Mitte des Aggregates entsteht eine Kompartimentierung im Aggregat. Außerhalb der AChE positiven Schicht befinden sich proliferierende Zellen.

In Aggregaten mit PE erfolgt eine klar gegliederte Reihenfolge der Anordnung differenzierter Zellen dadurch, daß zuerst ein Aussortieren bereits differenzierter Zellen gegen noch proliferierende Zellen erfolgt und sich eine weitere Schichtung durch geordnetes Ausscheiden mitotischer Zellen aus der Proliferation ergibt. Nach der Anlage zellulärer Schichten erfolgt auch die Ausbildung von Faserschichten. Nach 6 - 7 Tagen in Schüttelkultur tritt bei Färbung von Schnitten von Aggregaten mit FITC-PNA zum erstenmal eine Anordnung dieses Markers als Schichtstruktur auf und zwar an der Peripherie des Aggregates. Als erste PNA positive Schicht tritt also diejenige Schicht auf, die der Grenzschicht der ONL zum PE der intakten Retina entspricht.

### 3.2.3. Histologie der Aggregate aus Retinazellen des Embryonaltages E6

Bei der Reaggregation einer dissoziierten, rein retinalen E6 Zellpopulation entstehen zwei Arten von R-Aggregaten: "Kleine" Aggregate mit einem Durchmesser bis 0,3 mm und "große" Aggregate, deren Durchmesser bis zu 2,4 mm beträgt. Bei der Einteilung in die beiden Typen von Aggregatgrößen sind die Grenzen unscharf, jedoch erleichtert eine solche Grobeinteilung in Typen von Aggregaten die Beschreibung der Ergebnisse. Die großen Aggregate entstehen durch die Fusion kleiner Aggregate. Eine solche Fusion und damit die Entstehung von Aggregaten mit einem großen Durchmesser wird nie beobachtet, wenn zu Beginn des Reaggregationsexperimentes PE-Zellen zu den Retinazellen gegeben werden. Die in solchen gemischten Kulturen entstehenden RPE-Aggregate besitzen nach 14 - 21 Tagen in Kultur relativ konstante Durchmesser, die zwischen 0,2 und 0,4 mm liegen.

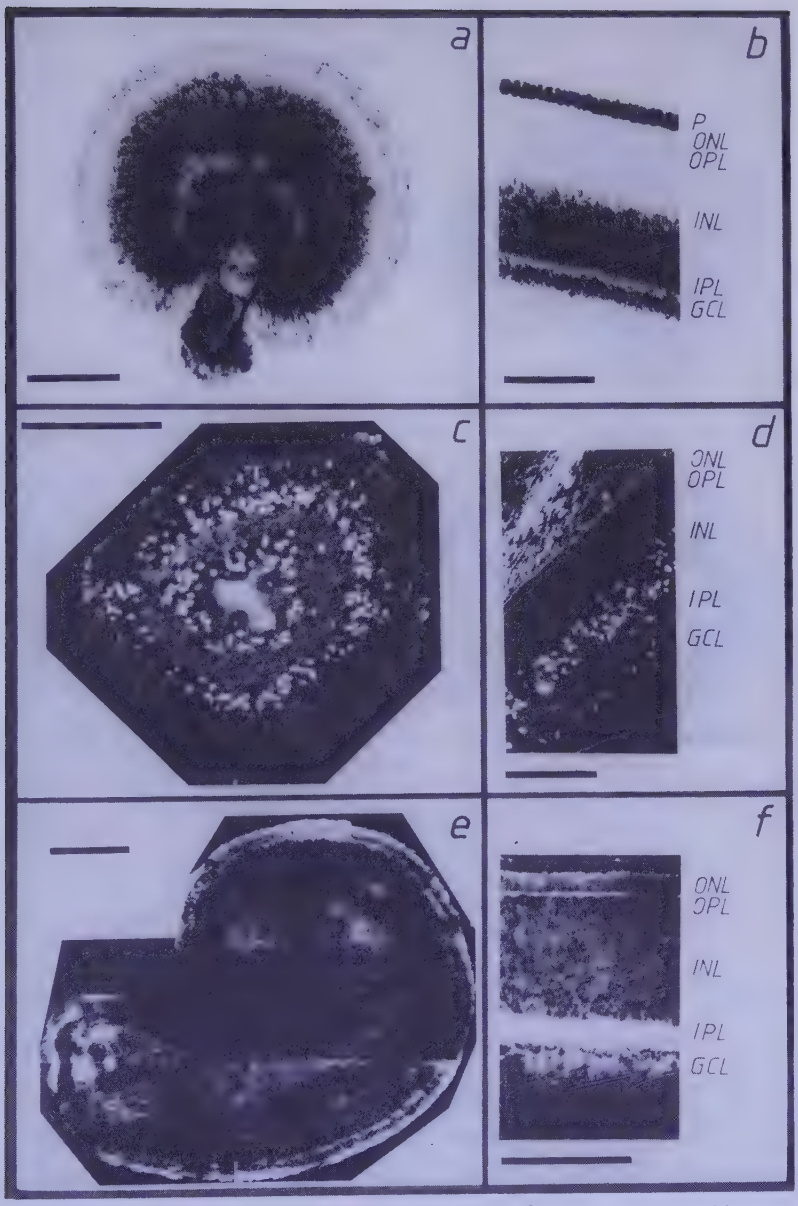



Abb. 13: Abb. 13 zeigt RPE-Aggregate aus E6 Zellen nach 19 - 21 Tagen in Schüttelkultur. Der PE-Anteil wird im Verlaufe der Aggregation aus dem Aggregat ausgeschleust oder bleibt an der Peripherie des Aggregates angehaftet (Abb. 13a). In der linken Spalte sind Schnitte von RPE-Aggregaten, in der rechten Spalte Schnitte der intakten Retina, gefärbt mit der histochemischen AChE Reaktion (Abb. 13a,b E10 Retina), mit dem Fluoreszenzfarbstoff LY (Abb. 13c,d E12 Retina) und dem Lektin FITC-PNA (Abb.13 e,f E12 Retina), abgebildet. Die Färbung der Aggregate (a,c,e) zeigt dieselbe Sequenz von Schichten von außen nach innen wie die Retina in vivo (b,d,f). Alle Kalibrierungsbalken entsprechen 0,1 mm.

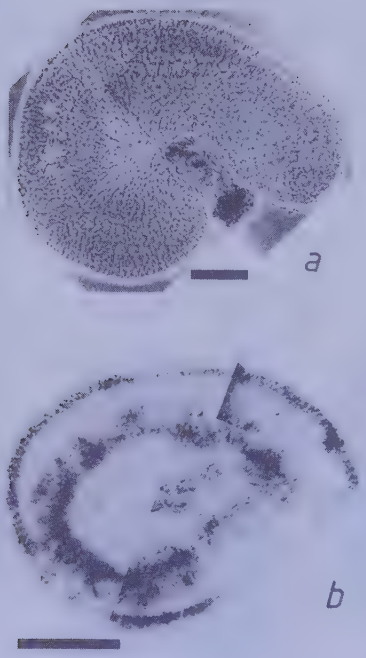



Abb. 14: Abb. 14a zeigt eine Phasenkontrastaufnahme durch einen Schnitt eines RPE-Aggregates aus E6 Zellen nach 21 Tagen in Kultur, Abb. 14b zeigt die Färbung eines Schnittes zum histochemischen Nachweis der Cholinesterasen nach verlängerter Inkubation mit Butyrylthiocholin als Substrat. Bei dieser Prozedur wird zusätzlich die äußerste Schicht im Aggregat, die der ONL der intakten Retina entspricht, gefärbt. Die Kalibrierungsbalken entsprechen 0,1 mm.

Die Abb. 13 und 14 zeigen, daß RPE-Aggregate aus E6-Zellen nach 14 - 21 Tagen in Kultur in Schichten angeordnete, hochorganisierte Zellverbände bilden. Nicht alle Aggregate besitzen diesen sehr hohen Organisationsgrad. Tabelle 5 gibt einen Überblick über den prozentualen Anteil dieser hochorganisierten Aggregate in Abhängigkeit von der Zeit im Kulturmedium. Er liegt zwischen 14 und 21 % der Aggregate.

Tabelle 5

Häufigkeit hochorganisierter Aggregate

| Alter der Retina | Tage in Kultur | Gesamtzahl der Aggregate | Anzahl hochorganisierter Aggregate | % hochorganisierter Aggregate |
|---|---|---|---|---|
| E6 | 14 | 131 | 18 | 13,7 |
| E6 | 16 | 130 | 20 | 15,4 |
| E6 | 19 | 151 | 32 | 21,2 |
| E6 | 21 | 109 | 19 | 17,4 |
| E5 | 19 | 767 | 199 | 25,9 |
| E7 | 18 | 146 | 2 | 1,4 |

Die Färbemuster, die nach der Färbung der Schnitte der Aggregate mit den drei Markern AChE, LY und FITC-PNA erhalten werden, ergeben dieselbe Sequenz gefärbter Schichten in Schnitten von RPE-Aggregaten und E10 - E12 Retinae in vivo von außen nach innen gesehen. Die äußerste Schicht der Aggregate wird durch FITC-PNA gefärbt (Abb. 13e). Diese Schicht entspricht der Grenzschicht zwischen der ONL und dem PE der intakten Retina. Die ONL selbst wird nur schwach oder überhaupt nicht von den drei angewandten Markern gefärbt. Jedoch induziert in dieser Schicht eine verlängerte Inkubtion der geschnittenen Aggregate mit Butyrylthiocholin als Substrat eine Cholinesterasereaktion (Abb. 14b). Diese Beobachtung steht in Einklang mit den Ergebnissen von Layer (44), der unter gleichen Bedingungen die Färbung der ONL in der intakten E18 Retina nachwies. Die OPL ist in RPE-Aggregaten und Retinae durch eine dünne, PNA gefärbte Schicht innerhalb der ONL charakterisiert. Die zum Innern des Aggregates folgende Schicht zeigt die Charakteristika der INL der Retina, weil sie LY aufnimmt (Abb. 13c), mit der AChE Reaktion gefärbt (Abb. 13a) und nicht durch PNA gefärbt wird (Abb. 13e). Weiter zur Mitte hin ist ein relativ breites Band in den Aggregaten, ähnlich der IPL, mit schwacher Faserfärbung durch LY (Abb. 13c), starker Färbung in der äußeren Hälfte durch AChE Reaktionsprodukt (Abb. 13a) und schwacher Färbung über die ganze Breite durch PNA (Abb. 13e). Die IPL ist in Aggregaten relativ dick. Die nachfolgende Schicht enthält AChE (Abb. 13a), und einige Zellen nehmen LY auf, wie das zu erwarten wäre, wenn eine GCL mit "displaced" amakrinen Zellen ausgebildet wird (Abb. 13c,d). Ob die Ganglienzellen in einer Schicht mit klarer Grenze angeordnet sind, ist mit diesen Methoden schwierig zu zeigen, da die Auflösung der angewandten

Färbemethoden zum Zentrum der Aggregate hin abnimmt. Aus denselben Gründen ist der innerste Kern der Aggregate nicht definiert; möglicherweise sind dort keine geordneten Strukturen anzutreffen.

Insgesamt ist die Anordnung der Schichten der sehr hoch geordneten Aggregate sehr ähnlich der einer E10 - 12 Retina in vivo. Die Aggregate scheinen eine normale Sequenz von Zell- und Faserschichten zu besitzen, die aber stark gekrümmt sind und annähernd Kugelform besitzen. In diesem Zusammenhang sei noch einmal auf die Größe der Aggregate hingewiesen, die mit 0,2 - 0,4 mm Durchmesser etwa doppelt so groß ist wie die Dicke einer intakten E10 - E12 Retina.

Im Vergleich zu den hochgeordneten Aggregaten aus E6 Retina- und PE-Zellen, bei denen eine Anordnung von Schichten wie in der Retina in vivo erfolgt, besitzen die in der Größe ähnlichen "kleinen" R-Aggregate aus E6 Retinazellen als äußerste Schicht in der Regel eine AChE positive Schicht (Abb. 15b); in manchen Präparaten fehlt allerdings diese färbbare Außenschicht. Die benachbarte Schicht besitzt Bindungsstellen für FITC-PNA (Abb. 15f). Danach folgt wiederum eine AChE positive Zone (Abb. 15b) in einem Bereich, in dem auch die LY positiven Zellen angesiedelt sind. Im Zentrum des Aggregates färbt dann nur noch FITC-PNA. Da AChE Reaktionsprodukt in der GCL und in der inneren Hälfte der INL in vivo gefunden wird, FITC-PNA in vivo die Faserschichten färbt und LY in der inneren Hälfte der INL, entspricht der Schichtenaufbau in Aggregaten von außen nach innen vermutlich der Folge GCL, IPL und INL.

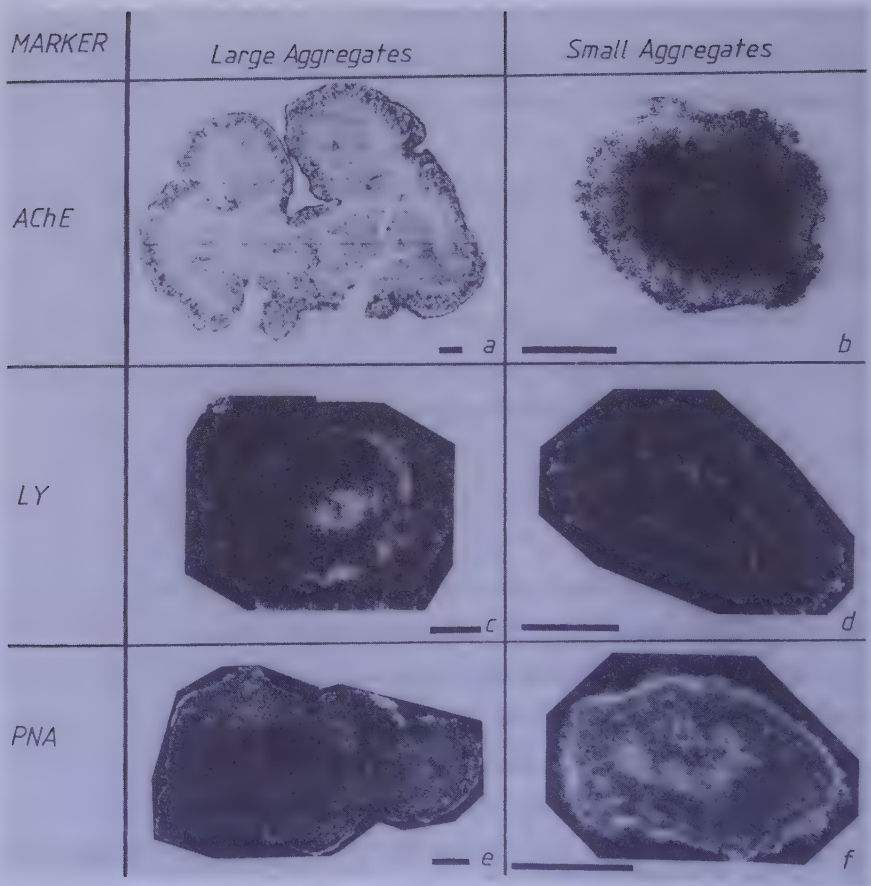



Abb. 15: In Abb. 15 sind die Schnitte von R-Aggregaten, entstanden aus E6 Retinazellen nach 21 Tagen in Kultur, und Färbung mit den drei Markern AChE, LY und FITC-PNA dargestellt. In der Spalte "Large Aggregates" (Kalibrierungsbalken 0,3 mm) sind die Färbemuster der Aggregate mit einem Durchmesser von 0,3 bis 2,4 mm dargestellt, in der Spalte "Small Aggregates" (Balken entspricht 0,1 mm) die Färbemuster der Aggregate mit einem Durchmesser bis zu 0,3 mm.

R-Aggregate mit einem großen Durchmesser (bis zu 2,4 mm) sind ein Fusionsprodukt kleiner Aggregate. Auch diese Art von Aggregaten zeigt außen eine schmale Schicht mit AChE positiven Zellen (Abb. 15a). Daran schließt sich auch hier eine Schicht mit PNA-Rezeptoren an (Abb. 15e). Danach folgt eine Schicht, die AChE gefärbte Zellen besitzt und reich an Rosetten ist (15 a,e). Diese Rosetten sind stark anfärbbar mit dem Lectin FITC-PNA. In diesem Bereich liegt auch ein LY positives Band von Zellen (Abb. 15c). In jedem dieser großen Aggregate werden Zellen im Kern von LY stark gefärbt. Auch bei diesen "großen" Aggregaten kann von außen nach innen eine der GCL, der IPL und der INL ähnliche Schichtung erkannt werden. Die Schicht, die die Marker der INL trägt, ist in Rosetten organisiert. Um dem großen Zellhaufen im Zentrum dieser Aggregate eine Schichtung zuordnen zu können, fehlen geeignete Marker.

Zusammenfassend kann gesagt werden: E6 Retinazellen sind in der Lage, in Aggregaten geordnete Schichten auszubilden. Nach 14 - 21 Tagen in Kultur entsteht eine Schichtung, die von außen nach innen der Folge GCL, IPL und INL der Retina in vivo entspricht. Werden diesen E6 Retinazellen zu Beginn der Reaggregation PE-Zellen beigemengt, werden alle Schichten einer E10-E12 Retina in Schüttelaggregaten rekonstruiert. Die Schichtstruktur ist schärfer ausgebildet, und ihre Reihenfolge ist, verglichen mit R-Aggregaten aus E6 Retinae, umgedreht: Von außen nach innen findet man die ONL, OPL, INL, IPL und GCL.

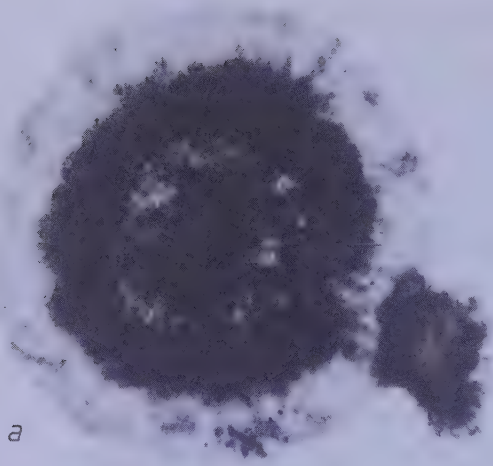
Tabelle 6

| Alter der Retina | Alter des Pigmentepithels | PE im Zentrum des Aggregates % | Aggregate mit PE an der Peripherie % | Aggregate ohne PE % |
|---|---|---|---|---|
| E6 | E6 | 2,3 | 7,8 | 89,9 |
| E7 | E7 | 10 | 2,9 | 87,1 |
| E9 | E9 | 31,7 | 1,8 | 66,5 |
| E6 | E9 | 27,1 | 24,7 | 48,3 |
| E5 | E7 | 4,2 | 27,3 | 68,5 |

Mit Aggregaten aus E6 Retina- und E9 PE-Zellen wurde untersucht, ob PE-Zellen mit zunehmendem Alter des Gewebes ihren Einfluß auf die Anordnung der Zellen in Schichten im Aggregat verlieren. Tabelle 6 macht deutlich, daß mit zunehmendem Alter der PE-Zellen weniger Aggregate in der Lage sind, die PE-Zellen auszuschleusen. Bei der Aggregation von E6 Retina mit E9 PE-Zellen verbleibt in 27 % der Aggregate das PE als Kern im Aggregat, bei 25 % der Aggregate wurde das PE an die Peripherie des Aggregates ausgeschleust, und 48 % der Aggregate besaßen keinen PE-Anteil mehr nach 14 Tagen in Kultur. Die Ordnung der Schichtung im Aggregat nimmt mit höherem Alter des PE nicht ab. Die Schichtung im Aggregat ist sehr ähnlich der in Abb. 13a abgebildeten. Dies bedeutet, daß die Fähigkeit des PE, eine hochgeordnete Schichtung in Aggregaten aus E6 Retinaeinzelzellen zu induzieren, mit zunehmendem Alter des PE nicht verloren geht.

### 3.2.4. Aggregate aus E5 Retina-Zellen

Aus E5 Retinazellen entstehen durch Beimengung von E7 PE-Zellen Aggregate, die einen sehr hohen Grad der Ordnung bezüglich ihrer Anordnung in Schichten besitzen. Mit über 25 % (Tabelle 5) liegt der Prozentsatz hochgeordneter Aggregate noch deutlich höher als bei RPE-Aggregaten aus E6 Zellen (um 20 %). Nur sehr wenige Aggregate (4,2 %) haben noch einen PE-Anteil im Zentrum des Aggregates. Bei einem höheren Anteil von Aggregaten (27,3 %) wurde das PE zur Peripherie des Aggregates ausgeschleust. Die übrigen Aggregate haben ihren PE-Anteil im Verlaufe der Aggregation verloren.



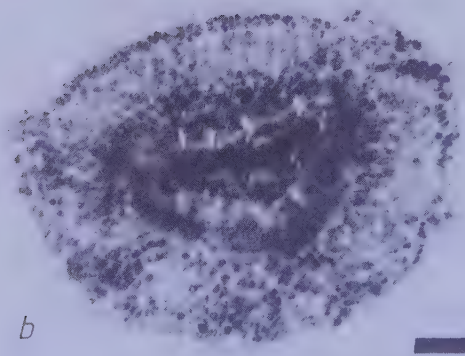




Abb. 16: Hier werden RPE-Aggregate, entstanden aus E5 Retina- und E7 PE-Zellen, dargestellt. Die Schichtstruktur kann noch besser aufgelöst werden als bei RPE-Aggregaten aus E6 Zellen. Die DIC-Nomarski-Optik zeigt, daß um den allerinnersten, mit den angewandten Markierungsprozeduren nicht identifizierbaren, Kern, die Ganglienzellen als Schicht auftreten (Abb. 16b, weiße Pfeile). In Abb. 16a ist die Färbung eines Schnittes durch ein Aggregat nach 20 Tagen in Kultur, gefärbt mit der histochemischen AChE Reaktion, abgebildet. Der Kalibrierungsbalken entspricht 0,1 mm.

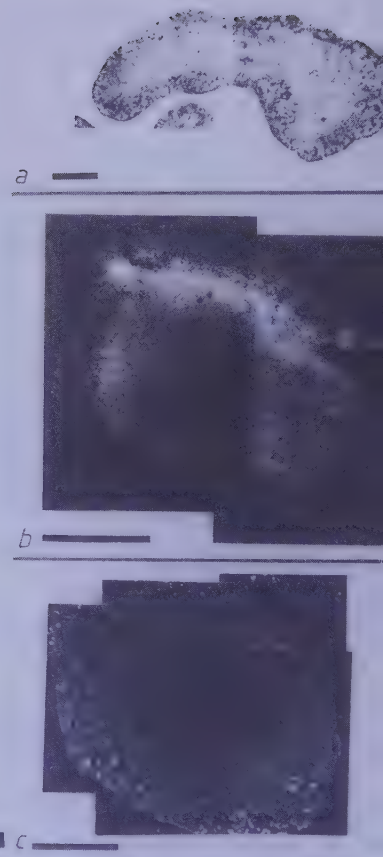



Abb. 17: Bei R-Aggregaten, entstanden aus E5 Einzelzellen, ist keine Klassifizierung in große und kleine Aggregate möglich. Abb. 17 zeigt Schnitte durch Aggregate aus E5 Retinazellen. Abb. 17a zeigt einen AChE gefärbten Schnitt nach 18 Tagen in Kultur, Abb. 17b einen LY gefärbten Schnitt nach 21 Tagen in Kultur und Abb. 17c einen FITC-PNA gefärbten Schnitt durch ein Aggregat nach 18 Tagen in Kultur. Alle Kalibrierungsbalken entprechen 0,3 mm.

In Abb. 16a ist ein AChE gefärbter Schnitt durch ein Aggregat aus E5 Retina- und E7 PE-Zellen dargestellt. Das Färbemuster ist sehr ähnlich dem für RPE-Aggregate aus E6 Zellen (Abb. 13a). Die DIC-Nomarski-Optik, angewandt auf einen mit Butyrylthiocholin als Substrat gefärbten Schnitt, zeigt deutlich die Anordnung dieses Aggregattyps in Zell- und Faserschichten (Abb. 16b). In Abb. 16b (weiße Pfeile) ist die Anordnung der Ganglienzellen als Schicht im Zentrum des Aggregates deutlich erkennbar. Im Gegensatz zu RPE-Aggregaten aus E6 Zellen sind die ChE positiven Zellen im Zentrum des Aggregates, die als Ganglienzellen zu deuten sind, in einer deutlich ausgeprägten Schicht angeordnet. Auch bei diesen Aggregaten ist aber der allerinnerste Kern des Aggregates mit den benutzten Markern nicht zu identifizieren.

R-Aggregate aus E5 Retinazellen bilden eine geringere Ordnung bezüglich der Anordnung in Schichten als vergleichbare R-Aggregate aus E6 Retinazellen. Die Zellen dieser Aggregate zeigen ein deutliches Aussortierungsverhalten. Die histochemische AChE Reaktion (Abb. 17a) zeigt ein Band gefärbter Zellen an der Peripherie des Aggregates. Weiter zum Zentrum des Aggregates hin kommt eine Zone mit fleckiger Verteilung des AChE Produktes. Zur Mitte des Aggregates hin nimmt die Färbung ab. Mit LY kann bei den Aggregaten aus E5 Retinazellen ein klares Aussortierungsverhalten beobachtet werden. Es ergibt sich ein stark gefärbter, ausgedehnter Kernbereich, an dessen Grenzen besonders viele LY positive Zellen lokalisiert sind. Im äußeren Drittel dieser Aggregate befinden sich nur wenige gefärbte Zellen (Abb. 17b). Ein Aussortierungsverhalten retinaler Zellen ist ebenfalls nach Färbung mit FITC-PNA zu beobachten. Es ergeben sich ein unge-

färbtes Zentrum im Aggregat und eine breite Zone mit fleckigem Auftreten von PNA-Rezeptoren an der Peripherie des Aggregates (Abb. 17c). Bei Aggregaten aus E5 Retinazellen läßt sich mit den vorhandenen Markern zwar eine Aussortierung von Zellen im Aggregat belegen, aber keine Anordnung in Schichten mit definierten Begrenzungen.

Zusammengefaßt zeigen die Resultate der Aggregationsexperimente mit E5 Retinazellen, daß die Anordnung retinaler Zellen in Schichten in Aggregaten aus E5 Retina- und E7 PE-Zellen noch besser ausgeprägt ist, als in RPE-Aggregaten aus E6 Zellen, weil auch die Anordnung der Ganglienzellen als Schicht im Zentrum des Aggregates aufgelöst werden kann. Dieser hohe Grad der Ordnung in dieser Art von Aggregaten ist insofern erstaunlich als Aggregate aus E5 Retinazellen ohne Beimengung von PE-Zellen noch weniger geordnet sind als vergleichbare Aggregate aus E6 Retinazellen. Diese Beobachtung unterstützt die bereits oben beschriebene Interpretation, daß die Beimengung von PE-Zellen während des Aggregationsprozesses zu einer relativ hochgeordneten Anordnung proliferierender Zellen führt. Das PE trägt sehr früh während des Aggregationsvorganges zur räumlichen Ordnung einer Subpopulation von Zellen, vermutlich proliferierender Zellen, im Aggregat bei und hilft bei der Erstellung einer frühen räumlichen Ordnung im Aggregat, die zur Trennung proliferierender und bereits differenzierter Zellen führt.

3.2.5. Aggregate aus Retinazellen aus Stadien nach E6

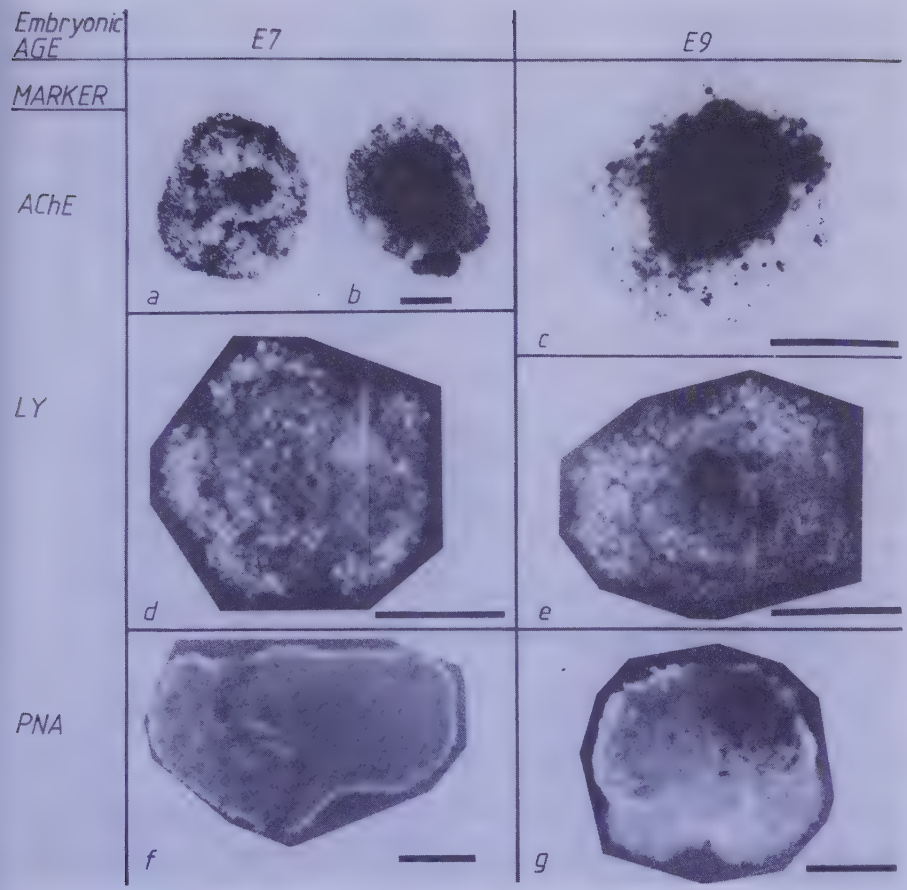



Abb. 18: Abb. 18 zeigt RPE-Aggregate aus E7 (linke Spalte) und E9 (rechte Spalte) PE-Gewebe. Abb. 18a,b,c zeigen die Färbung der Schnitte mit der histochemischen AChE Reaktion, Abb. 18d,e die Färbung mit LY und Abb. 18f,g die Färbung mit FITC-PNA. Alle Größenbalken entsprechen 0,1 mm.

Um zu untersuchen, bis zu welchem Alter des dissoziierten Retina- und PE-Gewebes eine histotypische Reaggregation dieser Gewebe möglich ist, wurden Aggregate aus Zellen der Entwicklungsstadien E7 - E10 angesetzt. Bei R- und RPE-Aggregaten aus Geweben dieser Entwicklungsstufen beobachtet man eine geringere Fähigkeit der Schichtenbildung. Die Zellen zeigen aber ein grobes Aussortierungsverhalten. Bei RPE-Aggregaten aus E7 Zellen zeigen noch 1,4 % der Aggregate eine Anordnung in Schichten (Tab. 2, Abb. 18b). Bei RPE-Aggregaten aus E9 Zellen wird keine Schichtung mehr, sondern nur noch grobe Aussortierung beobachtet (Abb. 18c,e). Ein weiteres Charakteristikum dieser Aggregate ist ihre, mit zunehmendem embryonalem Alter der Zellen, zu Beginn des Aggregationsvorganges wachsende Tendenz, den PE-Anteil im Zentrum des Aggregates zu behalten. Bei RPE-Aggregaten aus E6 Zellen wird nur in 2,3 % der Aggregate der PE-Anteil im Zentrum des Aggregates gefunden. Bei RPE-Aggregaten aus E7 Zellen ist dies in 10 % der Fälle und bei RPE-Aggregaten aus E9 Zellen in 31,7 % der Fälle beobachtbar (Tab. 6).

RPE-Aggregate aus E7 bzw. E9 Zellen besitzen einen annähernd einheitlichen Durchmesser (0,2 mm - 0,4 mm), vergleichbar mit den Aggregaten aus entsprechenden E6 Zellen. Im Gegensatz dazu besitzen R-Aggregate aus E7 - E9 Zellen weiterhin die Fähigkeit zur Fusion und zur Bildung von Aggregaten mit einem großen Durchmesser in der obigen Definition. Diese Fähigkeit zur Fusion geht ab dem Entwicklungsstadium E10 verloren.

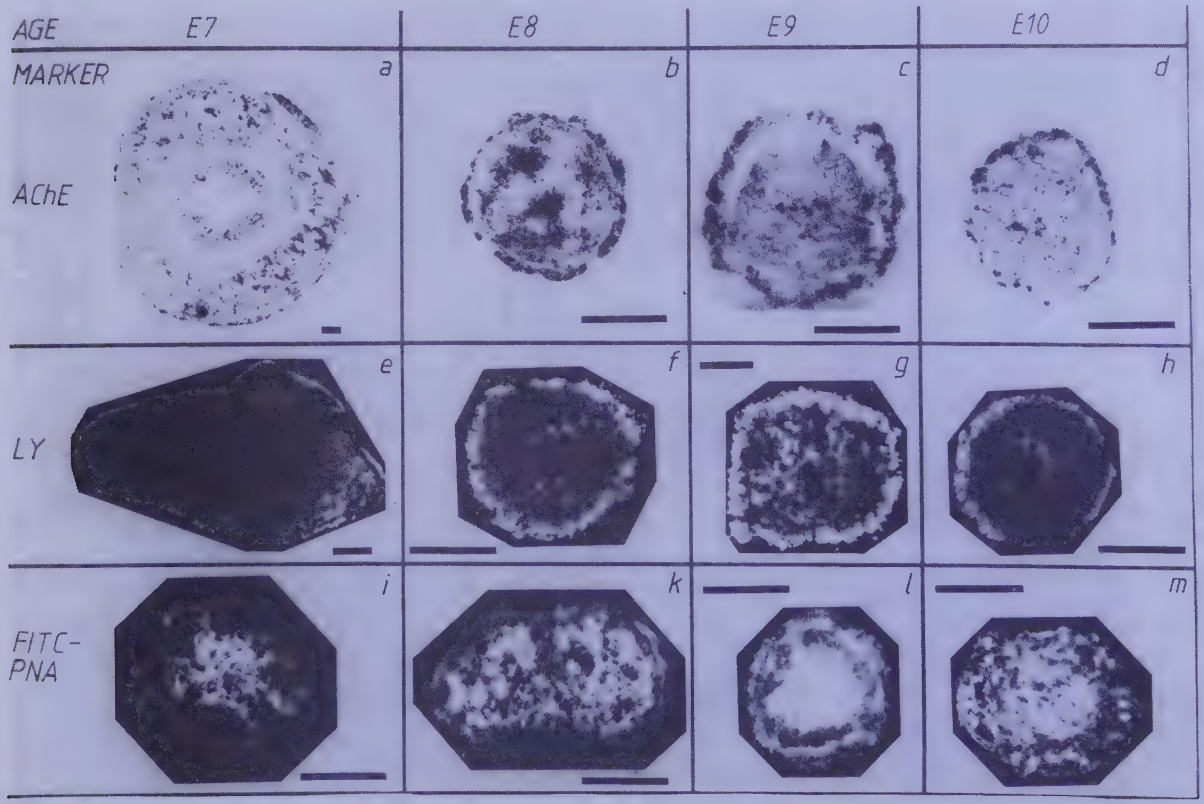
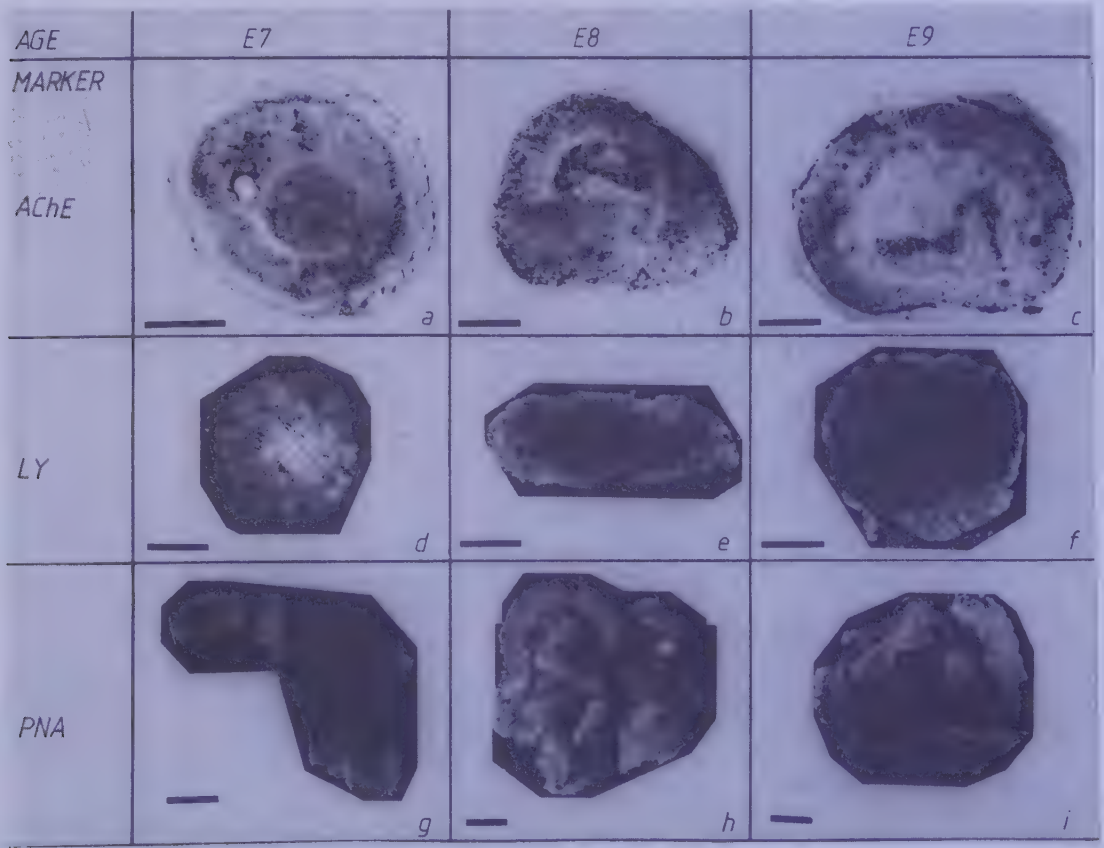

AGE
E7
E8
E9
E10
MARKER
AChE
a
b
c
d
LY
e
f
g
h
FITC-
PNA
i
k
l
m

Abb. 19: Zeigt Schnitte von R-Aggregaten aus E7, E8, E9 und E10 Einzelzellen nach 20 (E7) und 21 (E8 - E10) Tagen in Kultur. Die Schnitte sind gefärbt mit den Zellmarkern AChE (Abb. 19a-d), LY (Abb. 19e-h) und dem Fasermarker FITC-PNA (Abb. 19i-m). Die Kalibrierungsbalken entsprechen 0,1 mm.

Verglichen mit "kleinen" R-Aggregaten besitzen RPE-Aggregate aus E7 und E9 Zellen eine umgekehrte Polarität. Die AChE positiven Zellen befinden sich im Zentrum der RPE-Aggregate (Abb. 18b,c) und an der Peripherie der Aggregate (Abb. 19a-d). Bei RPE-Aggregaten ist nach Bindung von FITC-PNA nur die äußerste Schicht gefärbt (Abb. 18f,g), während bei kleinen R-Aggregaten das Zentrum des Aggregates immer gefärbt und manchmal auch der Rand des Aggregates, dann aber nicht als zusammenhängende Schicht (Abb. 19 i-m). Die Anwendung von LY ergibt bei Aggregaten die mit, und ohne PE-Zellen gebildet wurden in jedem Fall eine Färbung von Zellen an der Peripherie der Aggregate (Abb. 19e-h, Abb. 18d,e). Die Gründe für dieses Verhalten sind nicht klar.

E10 Retinazellen bilden keine Aggregate mit großem Durchmesser. Bei großen R-Aggregaten aus E7 - E9 Retinazellen sind die einzelnen Färbungen nicht mehr eindeutig Schichten zuzuordnen. Die Färbung erscheint häufig diffus und über den ganzen Schnitt des Aggregates verteilt (Abb. 20).

Abb. 20: Hier sind Schnitte großer R-Aggregate mit einem Durchmesser > 0,3 mm, entstanden aus E7, E8 und E9 Einzelzellen nach 20 Tagen (E7) und 21 Tagen (E8, E9) in Kultur, abgebildet. Aus E10 Retinazellen entstehen keine großen Aggregate. Abb. 20a-c zeigt die Färbung mit der histochemischen AChE Reaktion, Abb. 20d-f die Färbung mit LY und Abb. 20g-h die Färbung mit FITC-PNA. DieKalibrierungsbalken entsprechen 0,3 mm.


AGE
E7
E8
E9
MARKER
AChE
LY
PNA
a
b
c
d
e
f
g
h
i

Als Fazit dieser Experimente kann zusammenfassend gesagt werden: Wird bei der Reaggregation von embryonalen Retina- oder Retina- und PE-Zellen Gewebe verwendet, das zu Beginn des Experimentes älter als E6 ist, so geht die Fähigkeit zur Schichtenbildung verloren. Mit zunehmendem Alter des retinalen Gewebes zu Beginn des Experimentes sind beigemengte PE-Zellen immer weniger in der Lage, auf die Anordnung retinaler Zellen in Schichten Einfluß zu gewinnen. Aber sowohl in RPE-Aggregaten als auch in R-Aggregaten mit kleinem Durchmesser ist ein grobes Aussortierungsverhalten retinaler Zellen beobachtbar. Die Polarität der Anordnung der Zellen ist in den beiden Typen von Aggregaten umgedreht. Die Färbungen mit den drei Markern liefern in R-Aggregaten mit einem großem Durchmesser kaum mehr Aussagen über Aussortierung und Schichtenbildung retinaler Zellen.

### 3.3. Einfluß des monoclonalen Antikörpers FC1 auf embryonale Retina-Einzelzellen in stationärer Zellkultur und in Schüttelaggregationsexperimenten

Der monoclonale Antikörper FC1, der von B. Imhof (54) zur Verfügung gestellt wurde, verhindert *in vitro* die Anhaftung von Hühnchenfibroblasten an Substrate. In Schnitten von *in vivo* Geweben ist das Antigen in den meisten Fällen nicht nachweisbar, es kann jedoch in der Lunge von Hühnchen mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden sichtbar gemacht werden.

In stationärer Zellkultur wurde der Einfluß dieses monoclonalen Antikörpers FC1 auf das Anhaften embryonaler E6 Retinazellen an Polylysin, auf die Rosettenbildung und das Faserwachstum untersucht; in Schüttelaggregationsexperimenten wurde der Einfluss auf das Reaggregationsverhalten dissoziierter E6 Retinaeinzelzellen getestet.

Kontrollexperimente (siehe Abb. 21 Spalte control) mit Retinazellkulturen auf Polylysin zeigen die Ausprägung von Differenzierungsmerkmalen wie Rosettenbildung (Abb. 21 control Tag 1) oder Faserwachstum (Abb. 21 Control Tag 4). In jedem Experiment haften die Zellen sehr gut auf ihrem Substrat.

Bei Zugabe von Antikörpern in einer Verdünnung von 1:100 erfolgt ebenfalls zunächst die Bindung der Zellen an Polylysin (Abb. 21 1:100 Tag 1 und 2), jedoch lösen sich die gebildeten Zellaggregate am Tag 3 in Kultur vom Substrat ab. Am Tag 4 in Kultur haben sich diese abgelösten Aggregate weitgehend in sehr kleine Zellaggregate und Einzelzellen aufgelöst. Diese Prozesse wurden für alle Antikörperkonzentrationen bis zu einer Verdünnung 1:400 beobachtet (Abb. 21 1:400). Bei dieser Antikörperkonzentration erfolgt allerdings nur noch eine geringe Dissoziation der abgelösten Zellklumpen. Bei der Antikörperverdünnung 1:500 sehen die Zellkulturen, verglichen mit der Kontrolle, normal aus. Es werden sowohl Rosetten (Abb. 21 1:500 Tag 1) als auch Fasern (Abb. 21 1:500 Tag 3 und 4) ausgebildet.

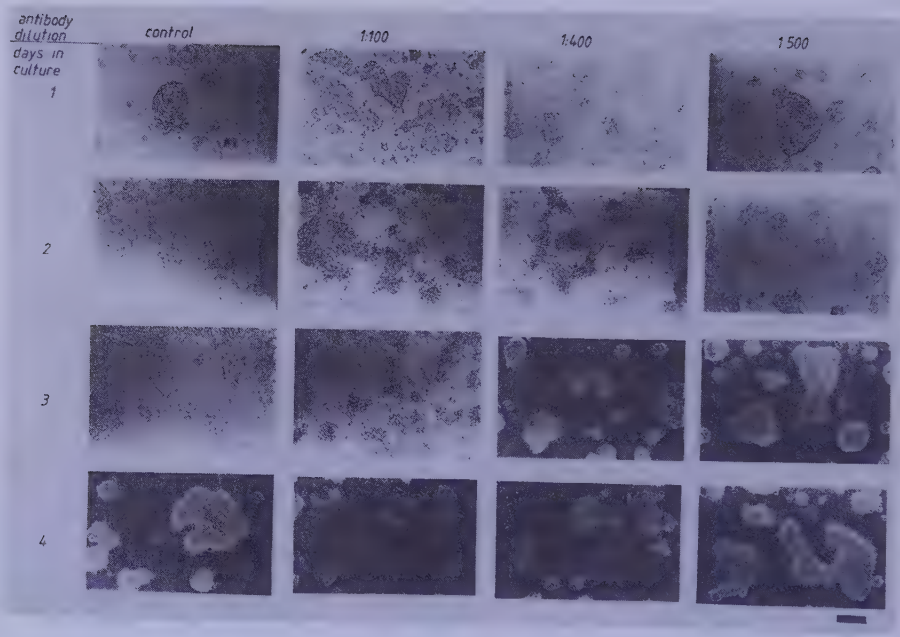

antibody dilution
days in culture
control
1:100
1:400
1:500
1
2
3
4

Abb. 21

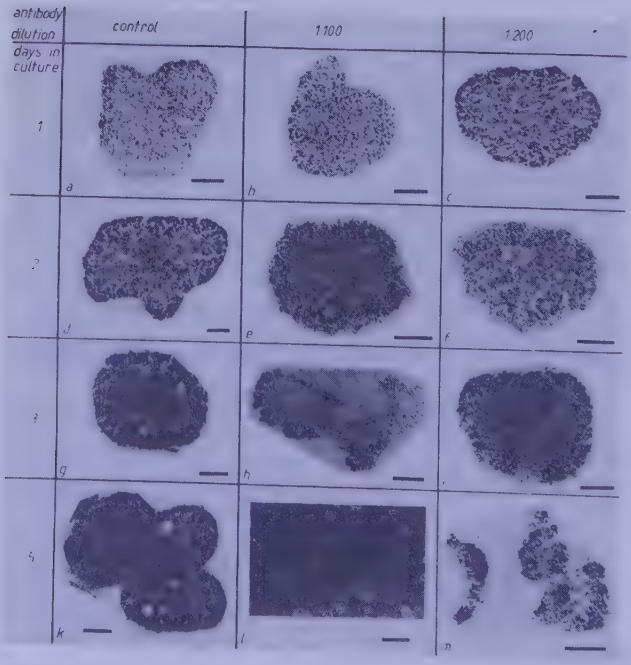

antibody dilution
days in culture
control
1:100
1:200
1
2
3
4
a
b
c
d
e
f
g
h
k
l
n

Abb. 22

Abb. 21: Zellkulturen aus E6 Retinazellen auf Poly-L-Lysin als Substrat in der Gegenwart des monoclonalen Antikörpers FC1 sind in Abb. 21 abgebildet. Von oben nach unten ist die Dauer des Experimentes als Tage in Kultur aufgetragen. Über jeder Spalte ist die jeweilige Antikörperkonzentration verzeichnet. Als Kontrolle diente die Gabe einer äquivalenten Menge PBS. Der Kalibrierungsbalken entspricht 0,1 mm.

Abb. 22 zeigt Schnitte von Schüttelaggregaten, entstanden aus E6 Retinaeinzelzellen in der Gegenwart des monoclonalen Antikörpers FC1, gefärbt mit Hämalaun/Eosin. Über den Spalten ist die Antikörperkonzentration angegeben. Von oben nach unten ist die Dauer der Reaggregation in Tagen aufgetragen. Alle Kalibrierungsbalken entsprechen 0,1 mm.

Bei der Reaggregation von Einzelzellen des Embryonaltages E6 in Gegenwart des monoclonalen Antikörpers FC1 in Schüttelkultur stellt man nach einem Tag noch keinen Unterschied im Aussehen der Schnitte der Aggregate mit und ohne Antikörper fest (Abb. 22 1. Reihe). Beide Arten von Kulturen bilden die, für die frühe Aggregation typischen, Rosetten aus. Auch am zweiten Tag sind noch keine gravierende Unterschiede zwischen Antikörper behandelten und unbehandelten Kulturen festzustellen (Abb. 22 2. Reihe).

Am dritten Tag in Kultur haben sich bei den Kontrollen die Lumen im Innern der Rosetten aufgelöst, was ein weiterer Schritt der Differenzierung in vitro bedeutet (Abb. 22g). Betrachtet man sich die Kultur mit der Antikörperkonzentration 1:200, so ist kaum ein Unterschied zwischen behandelter und unbehandelter Kultur vorhanden. Im Falle der Kulturen mit dem hohen Antikörpertiter (1:100) (Abb. 22h) enthält das Aggregat keine Rosetten mehr, sieht desorganisiert aus und beginnt sich aufzulösen.

Am 5. Tag der Aggregation besitzen die Kontrollaggregate große Rosetten im Aggregat (Abb. 22k). Die Aggregate mit hoher Antikörperkonzentration haben sich schon weitgehend aufgelöst (Abb. 22l), und auch die Aggregate mit niedriger Antikörperkonzentration besitzen keine Rosetten mehr und beginnen sich aufzulösen (Abb. 22m). In Schüttelkultur hatten die getesteten Antikörperkonzentrationen 1:300, 1:400 und 1:500 keinen Einfluß auf das Reaggregationsverhalten dissoziierter E6 Retinaeinzelzellen.

Behandelt man die Kulturen nur während der ersten 24 h der Aggregation mit dem monoclonalen Antikörper FC1, wäscht die Primäraggregate und nimmt sie für weitere 13 Tage in Kultur, so ist kein Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Kulturen feststellbar. Da ferner, wie oben bereits erwähnt, an den ersten beiden Tagen in Kultur Zellen auf Polylysin anwachsen und keine Unterschiede bezüglich der Entwicklung und Differenzierung der Schüttelaggregate während der ersten beiden Tage in Kultur feststellbar sind, könnte dies bedeuten, daß das Antigen von den Zellen während ihrer Differenzierung in vitro erst synthetisiert oder als extrazelluläre Matrixsubstanz sezerniert wird. Deshalb ist eine Beeinträchtigung der Aggregation durch den monoclonalen Antikörper FC1 erst mit dem Auftreten des Antigens im Verlauf des Aggregationsvorgangs möglich.

3.4. Aggregate aus dissoziierten E6 Tektumzellen

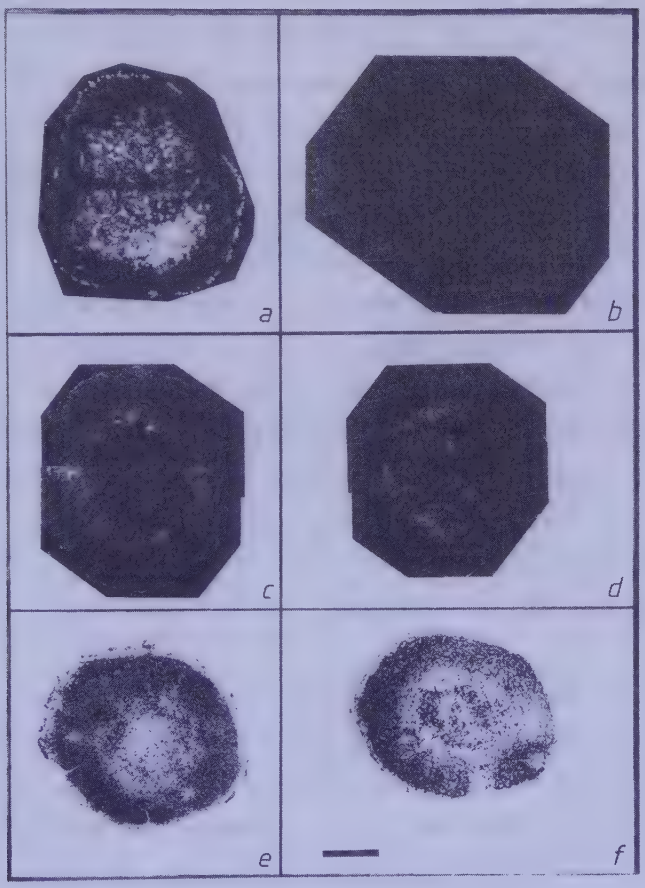



Abb. 23 zeigt Schnitte von Tektumaggregaten aus E6 Tektum-einzelzellen nach 14 Tagen (linke Spalte) und 21 Tagen (rechte Spalte) in Kultur. In Abb. 23a,b ist die Färbung der Aggregate mit LY, in Abb. 23c,d mit FITC-PNA und in Abb. 23e,f mit der histochemischen AChE Reaktion dargestellt. Der Kalibrierungs-balken entspricht 0,1 mm.

Die Zellen des optischen Tektums des Hühnchens wurden benutzt, um die Frage zu klären, ob auch Zellen anderer Teile des optischen Systems die Fähigkeit besitzen, zu aggregieren und sich auszusortieren. Aggregate aus Tektumzellen sind in der Größe einheitlicher als Aggregate aus Retinazellen, sie besitzen eine kugelige Gestalt und haben die Tendenz, sich im Innern im Verlauf der Aggregation aufzulösen, wobei Hohlräume entstehen. Die vordere Spalte der Abb. 23 zeigt jeweils Bilder von Schnitten von Aggregaten,die für 14 Tage im Kulturmedium gehalten wurden. In der zweiten Spalte sind Schnitte von Aggregaten abgebildet, die für 21 Tage in Kultur gehalten wurden. Betrachtet man die verschiedenen Färbungen, so wird zwar in allen Bildern ein Aussortierungsverhalten deutlich, jedoch kann über eine mögliche Schichtenbildung keine Aussage gemacht werden. Die Unterscheidung der Schichten ist aber auch in vivo im Tektum nicht leicht, da die einzelnen Marker nicht so eindeutig in Schichten angeordnet sind wie in der Retina.

Mit LY ergibt sich eine innen/außen Verteilung des Markers (Abb. 23 a,b). Nach 14 Tagen in Kultur ist das Zentrum stark gefärbt, nach 21 Tagen in Kultur nur noch schwach gefärbt. Nach 21 Tagen schließt sich von innen nach außen betrachtet dem breiten schwach gefärbten Zentrum eine Zone starker Färbung an. Die Zellen mit PNA-Rezeptoren Abb. (23 c,d) ordnen sich in Aggregaten aus tektalen Zellen in einem breiten Kern im Zentrum des Aggregates an, während die peripheren Regionen des Aggregates ungefärbt bleiben. Auch dies ist wieder ein Indiz für ein Aussortierungsverhalten tektaler Einzelzellen in Schüttelkultur. Mit der histochemischen AChE Reaktion (Abb. 23 e,f) wird annähernd der ganze

Schnitt durch ein Aggregat gefärbt, lediglich eine schmale Zone an der Peripherie des Aggregates bleibt ungefärbt. Auch mit diesem Marker läßt sich zwar eine grobe Aussortierung, aber keine geschichtete Anordnung tektaler Zellen in Schüttelkultur nachweisen.

# 4. DISKUSSION

## 4.1. Charakterisierung Lucifer Yellow gefärbter Zellen

In diesem Abschnitt 4.1. sollen folgende Punkte diskutiert werden: Der altersabhängige Verlauf der LY Färbung, der Aufnahmemechanismus für LY in retinale Zellen und die Zelltypcharakterisierung LY gefärbter Zellen in frühen und späten Stadien der embryonalen Entwicklung der Retina.

### 4.1.1. Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer Yellow in retinale Zellen in Abhängigkeit des Alters des Retinagewebes

In einem Schaubild, in dem die mit dem Fluoreszenzmikroskop ermittelte Anzahl LY gefärbter Zellen der Retina gegen das Alter des retinalen Gewebes aufgetragen ist, ergeben sich zwei Maxima. Das erste Maximum tritt am Tag E5 auf, danach durchläuft die Kurve ein Minimum an den Tagen E8 - E9 und steigt ab Tag E11 - E12 wieder an und endet bei 6 % gefärbten Zellen an den Tagen E18 - 19. Ein qualitativ ähnliches Schaubild wird bei analytischen Messungen des Prozentsatzes gefärbter Zellen mit FACS erhalten. Die Absolutwerte sind aber höher, da auch schwachgefärbte Zellen mitgezählt werden.

Einen Abfall in der Anzahl anfärbbarer Zellen nach E14 erhält man, wenn nicht intaktes Gewebe, sondern bereits dissoziierte Zellen mit LY gefärbt werden. In der späten embryonalen Entwicklung nach E14 ergibt sich unter diesen Bedingungen kein Anstieg der Anzahl anfärbbarer Zellen. Die Selektivität der Aufnahme des

Farbstoffes in Schüttelaggregaten geht verloren, wenn E6 Retinazellen nach der Dissoziation für 21 h mit BrdU behandelt werden. Es ergibt sich dann weder eine Anordnung der LY gefärbten Zellen in Schichten, noch werden diese im Aggregat aussortiert. Sie sind in ungeordneter Weise über das ganze Aggregat verteilt.

Die oben beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß LY als Differenzierungsmarker für Subpopulationen retinaler Zellen benutzt werden kann. Dies steht in Einklang mit Layer und Kotz (43), die die zeitlich-räumliche Ausbreitung des Farbstoffes in der Retina in vivo studierten. Der Fluoreszenzfarbstoff LY selbst besitzt keine physiologische Bedeutung, die biologische Signifikanz liegt vermutlich vielmehr im Mechanismus seiner selektiven Aufnahme begründet.

### 4.1.2. Zum Aufnahmemechanismus für Lucifer Yellow

Durch die oben beschriebenen Experimente ergibt sich kein direkter Hinweis auf den Aufnahmemechanismus, aufgrund dessen LY die anfärbbaren Zellen markiert; jedoch kann ausgeschlossen werden, daß die Aufnahme des Farbstoffes in die Zellen energieabhängig ist. Weder die Atmungshemmstoffe Natriumazid und Kaliumcyanid, noch die Glykolysehemmstoffe Natriumfluorid und Jodacetat, noch Dinitrophenol, das die Atmung von der oxydativen Phosphorilierung entkoppelt, verändern die Anzahl der LY gefärbten Zellen signifikant. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Ergebnissen von Sarthy et al. (59), die mit Cytochalasin B, Cyanid und Jodacatat bei Schildkröten (Pseudomonas elegans), Fröschen (Rana pipiens), Goldfischen (Carassius auratus) und Ratten zu ähnlichen Ergebnissen gekommen waren.

Ein wichtiger Hinweis bezüglich des Aufnahmemechanismus ergibt sich aus dem Vergleich der Anzahl gefärbter Zellen in einer intakten und dissoziierten Retina. Während der Prozentsatz gefärbter Zellen in frühen Entwicklungsstadien gleich ist, ist er in der späten Phase der embryonalen Entwicklung in der intakten Retina etwa doppelt so hoch wie in der dissoziierten Retina. Daraus kann geschlossen werden, daß in einer frühen Phase der Entwicklung intaktes Gewebe und Einzelzellen den Farbstoff mit verwandten Mechanismen aufnehmen, während in den späteren Stadien der Entwicklung ein Gewebe mit intakter Zellstruktur benötigt wird, um ein Färbeverhalten wie in histologischen Schnitten zu erhalten.

Ein Vergleich der zeitlichen Abfolge der LY Färbung mit dem Auftreten von gap junctions in der embryonalen Hühnchenretina liefert einen Hinweis zum Mechanismus, mit welchem der Farbstoff in die Retina aufgenommen werden könnte. Fujisawa et al. (20) fanden wenige gap junctions zwischen Retinazellen an der äußeren limitierenden Membran zum Zeitpunkt E3. Die Größe und Anzahl der gap junctions stieg beträchtlich bis Tag E6. Zu diesem Zeitpunkt traten sie nicht nur an der äußeren limitierenden Membran, sondern auch in tieferen Schichten der Retina auf. Am Tag E7,5 treten gap junctions zwischen den Zelloberflächen an der äußeren limitierenden Membran auf, während sie in tieferen Schichten wieder verschwunden sind. An E9 sind gap junctions selten geworden. Die Ähnlichkeit im zeitlichen Ablauf der LY Färbung in der frühen Entwicklungsphase der Retina und dem Auftreten von gap junctions legt die Vermutung nahe, daß der Farbstoff in der frühen Entwicklungsphase der Retina durch gap junctions aufgenommen

wird. Stewart (64) zeigte, daß LY von einer injiziierten Zelle auf eine andere, die funktionell z.B. synaptisch gekoppelt ist, übertragen werden kann. Benett et al. (4) zeigten in reaggregierten Blastomerenzellen von Fundulus, daß LY nach Injektion einer Zelle über gap junctions auf weitere, mit der injiziierten Zelle gekoppelten, Zellen übertragen wird.

### 4.1.3. Charakterisierung Lucifer Yellow gefärbter Zellen in der frühen Entwicklungsphase der embryonalen Retina

Den ersten Hiweis für eine Charakterisierung LY gefärbter Zellen in der frühen Entwicklungsphase (E6) der Retina bieten histologische und morphologische Kriterien (Layer et al (42) und Layer und Kotz (unveröffentlicht)). Bezüglich ihrer Lage in der Retina und ihrer Morphologie sind zwei verschiedene LY gefärbte Zelltypen unterscheidbar. Die zahlenmäßig größere Zellpopulation besitzt Fortsätze und eine sehr konstante Position der Zellkörper innerhalb der Retina. Deshalb liegt die Vermutung nahe, daß diese Zellpopulation von Neuroepithelzellen sich in einer definierten Zellzyklusphase befindet. Dies konnte durch die oben beschriebenen Experimente bestätigt werden, bei denen zu Beginn des Experimentes alle Retinae entweder mit $^{3}$H-Thymidin oder mit LY markiert wurden und nach diskreten zeitlichen Abständen die Markierung mit dem jeweiligen zweiten Marker durchgeführt wurde.

Die aus diesen Experimenten gewonnenen Daten zeigen, daß eine Population LY anfärbbarer Zellen auftritt, die 2 - 4 h nach der Inkorporierung von $^{3}$H-Thymidin, also nach dem Durchlaufen

einer mitotischen S-Phase, in der Lage ist, den Fluoreszenzfarbstoff selektiv aufzunehmen, aber vermutlich nach der Aufnahme des Farbstoffes nie mehr in der Lage ist, $^{3}$H-Thymidin zu inkorporieren. Bei diesen LY gefärbten Zellen handelt es sich um eine Zellpopulation, die ein Entwicklungsstadium direkt bei oder nach dem Ausscheiden aus dem mitotischen Zellzyklus durchläuft.

Ein möglicher Mechanismus zur Erklärung der Aufnahme des Farbstoffes ist, daß zu Beginn der Differenzierungsphase Zellen relativ unspezifisch Signale aus ihrer Umgebung aufnehmen, die zur weiteren Determinierung der Zellen führen. Auf diesem Wege würde der Farbstoff LY mit aufgenommen. Die selektive Aufnahme von LY in eine Subpopulation retinaler Zellen erfolgt bei 0°C in einem $Ca^{2+}$-freien Medium. Wird mit LY bei 37°C gefärbt, ergibt sich ein fleckiges Färbemuster fast aller Zellen. Vermutlich mit demselben Mechanismus wie LY wird der Fluoreszenzfarbstoff DAPI aufgenommen, der bei 37° DNA aller Zellen färbt. Wird mit diesem Farbstoff bei 0 °C gefärbt, so ist nur eine kleine Subpopulation retinaler Zellen in der Lage, diesen Farbstoff aufzunehmen. Dies ist überwiegend die gleiche Zellpopulation, die in einer E6 Retina mit LY gefärbt wird, wie Doppelmarkierungsexperimente zeigten. Das Ergebnis führt zu dem Schluß, daß retinale Zellen nach ihrem Ausscheiden aus der Proliferation eine Entwicklungsphase durchlaufen, während welcher niedermolekulare Stoffe wenig selektiv in die Zelle aufgenommen werden. Diese Phase könnte möglicherweise einem Entwicklungsstadium entsprechen, während welchem Zellen Differenzierungssignale aus der Umgebung der Zelle aufnehmen.

In einer E6 Retina werden zwei Populationen von Zellen mit LY gefärbt. Eine dieser Populationen besteht aus Zellen, die gerade ihre letzte Teilung gemacht haben und dann in der Lage sind, den Fluorezenzfarbstoff aufzunehmen. Diese Population von Zellen wird bei der Analyse von E5 Retinae von einer zweiten Population von Zellen zahlenmäßig überdeckt. Diese Population, die in weit geringerer Anzahl auch in E6 Retinae vorhanden ist, konnte nicht näher chrakterisiert werden. Mit der oben beschriebenen Doppelmarkierungsmethode mit $^{3}$H-Thymidin und LY ist es in der embryonalen Hühnchenretina zu gewissen Stadien der Entwicklung (E6) möglich, eine Population von Zellen zu erfassen, die gerade ihre letzte Teilung gemacht hat. Der Versuch, das Schicksal dieser am Tag E6 mit LY anfärbbaren, Zellen in Zellkultur weiterzuverfolgen, scheiterte, weil diese Zellen über längere Zeit in Kultur den Farbstoff wieder verlieren.

### 4.1.4. Charakterisierung von Lucifer Yellow gefärbten E11 - E14 Retinazellen

Zur Charakterisierung von LY gefärbten Retinazellen, älter als E11, wurden zwei Arten von Experimenten durchgeführt. Einerseits wurde versucht, mit retinotoxischen Substanzen Subpopulationen von Zellen zu eliminieren, in der Hoffnung, damit auch die LY gefärbten Retinazellen zum Verschwinden zu bringen, andererseits wurden fluoreszente Zellen mit FACS abgetrennt und der Versuch unternommen, diese biochemisch zu charakterisieren.

Als retinotoxische Substanzen wurden die gliatoxische Substanz $\alpha$-Aminoadipinsäure und Kainic Acid, die in den verwendeten Kon-

zentrationen vorwiegend amakrine und bipolare Zellen eliminiert (32), intravitreal gespritzt. Mit $\alpha$-Aminoadipinsäure wurde keine Veränderung des Färbemuster mit LY erzielt. Nach der Gabe von Kainic Acid waren der Hauptteil gefärbter Zellen in der inneren Hälfte der INL und alle gefärbten Zellen in der GCL verschwunden. Diese Ergebnisse liefern unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Ingham und Morgan (32) Hinweise, daß mit LY in einer späten Phase der embryonalen Entwicklung eine Subpopulation amakriner Zellen in der INL und "displaced" amakrine Zellen in der GCL der Retina des Hühnchens gefärbt werden. Diese Ergebnisse differieren beträchtlich von denen von Sarthy et al., die bei Schildkröten, Goldfischen, Fröschen und Ratten (59) bipolare Zellen in der INL gefärbt fanden.

In einem weiteren Experiment wurde der Anteil gefärbter Zellen in der GCL ermittelt. Es zeigte sich, daß der Prozentsatz dieser Zellen vom Tag E12 bis Tag E18 leicht, aber möglicherweise signifikant, von 22 % auf 24 % steigt. Ehrlich et al. (16) ermittelten einen Anteil "displaced" amakriner Zellen in der adulten Hühnchenretina von 35 %. Der Grund für das Anwachsen des prozentualen Anteils der "displaced" amakrinen Zellen liegt vermutlich nicht in der Zunahme der Anzahl dieser Zellen, sondern vielmehr im Einsetzen des selektiven Zelltodes von Ganglienzellen, der in der embryonalen Hühnchenretina ab Tag E12 beginnt (30).

Eine biochemische Charakterisierung der amakrinen bzw. "displaced" amakrinen Zellen sollte nach der Isolierung der fluoreszenten Zellen mit FACS mit biochemischen Mitteln erfolgen. Mittels Autoradiographie nach Gabe von $^{3}$H-Cholin als Vorstufe von

Acetylcholin fanden Baughman et al. (2) 6 % der Zellen in der INL und 19 % der Zellen in der GCL markiert. Layer (44) fand mit der histochemischen AChE Methode die GCL und Zellen in der inneren Hälfte der INL markiert. Imperato et al. (31) verloren mehr als 50 % der biochemischen Marker cholinerger und GABAerger Neurone in der Hühnchenretina nach intavitrealer Gabe von Kainic Acid. Weitere Hinweise auf den GABAergen Charakter amakriner Zellen lieferten die Bindungsstudien mit $^{3}$H-Muscimol (einem GABA Antagonisten) von Blanks et al. (5) in der Mäuseretina, von Yazulla in der Retina von Goldfischen (70) und Yazulla et al. (71) in der Hühnchenretina, sowie immunhistochemische Studien mit Antikörpern gegen das Enzym GAD von Famiglietti et al. in der Rattenretina (17), Brandon et al. (6) in der Retina des Kaninchens und die Aufnahmeexperimente von $^{3}$H-GABA von Brandon im Kanichen (6), Yazulla et al. (71) beim Hühnchen und Yazulla (70) im Goldfisch. Dopaminerge Neurone in der INL und Fasern in der IPL von Rindern beschreibt Osborne (56) durch das Auftreten von Catecholaminfluoreszenz, durch Metabolismus, Aufnahme und Abgabe von Noradrenalin. Auf Grund der Ergebnisse dieser Autoren wurden in Homogenaten der mit FACS isolierten, LY gefärbten Zellen Aktivitäten der Enzyme AChE, ChAT, GAD, TH und COMT bestimmt und Aufnahmeexperimente mit dem tritierten Neurotransmitter GABA durchgeführt.

Die biochemische Charakterisierung LY gefärbter Zellen zeigt die 2,5 fache Erhöhung der GAD Aktivität in isolierten, LY gefärbten Zellen gegenüber Zellen, die mit FACS als nicht fluoreszent erkannt wurden. Ebenso konnte eine etwa 2 fache Anreicherung $^{3}$H-

GABA akkumulierender Zellen in der Fraktion LY gefärbter Zellen gezeigt werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß eine Subpopulation LY gefärbter, amakriner oder "displaced" amakriner Zellen GABA als Neurotransmitter benützt. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Ergebnissen von Yazulla et al. (71), Yazulla (70), Blanks et al. (5), Famiglietti et al. (17) und Brandon et al. (6), die bei Hühnchen, Goldfischen, Mäusen, Ratten und Kaninchen Hinweise GABAerger Transmission amakriner Zellen fanden.

Die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung isolierter, LY gefärbter Zellen zeigen außerdem, daß diese Zellen vermutlich keine cholinerge oder catecholaminerge Neurotransmitter benutzen, da die Aktivitäten der Enzyme AChE und ChAT in einer LY gefärbten Zellpopulation gegenüber der einer frisch dissoziierten Retinazellpopulation um den Faktor 6 erniedrigt sind und die Aktivitäten der Enzyme TH und COMT in Homogenaten isolierter, LY gefärbter Zellen nicht nachgewiesen werden konnten. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Hayden et al. (27), die in der Retina von Kaninchen Ganglienzellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff retrograd färbten und in den nicht fluoreszierenden Neuronen nach Gabe von tritiertem Cholin $^{3}$H-Acetylcholin fanden; d.h. diese Autoren beschreiben "displaced" amakrine Zellen des Kaninchens als cholinerg.

## 4.2. Reaggregation dissoziierter embryonaler Hühnchenretinazellen

### 4.2.1. Proliferation und Zellvermehrung in vitro

In vivo vermehren sich Retinazellen um den Faktor 12 vom Embryonaltag E6 bis E10 (14). Es stellte sich deshalb die Frage, wieviele Zellen in Schüttelaggregaten von dissoziierten E6 Retinazellen neu gebildet werden. Die oben besprochenen Ergebnisse zeigen, daß die Anzahl der retinalen Zellen während 9 Tagen in Schüttelkultur auf das Vierfache, ohne Beimengung von PE-Zellen, und auf das Fünffache in der Gegenwart von PE-Zellen ansteigt. Während des ersten Tages in Kultur wird in beiden Arten von Aggregaten beträchtlich weniger $^{3}$H-Thymidin inkorporiert als in der intakten Retina des korrespondierenden Alters. Nach einem weiteren Tag in Kultur sind die Einbauraten in intaktes Gewebe und in Aggregate weitgehend identisch. Nach diesem Zeitpunkt nehmen die Einbauraten von $^{3}$H-Thymidin während der Entwicklung der intakten Retina und Retinazellen in R-Aggregaten annähernd identische Werte an. Dagegen verbleibt die Einbaurate von $^{3}$H-Thymidin in RPE-Aggregate drei weitere Tage auf einem erhöhten Level. In den beiden Tagen danach sinkt die Einbaurate von $^{3}$H-Thymidin in RPE-Aggregate auf die Werte für intakte Retina- und PE-Gewebe ab. Quantitativ zeigen die oben beschriebenen Ergebnisse, daß in R-Aggregaten während 14 Tagen in Kultur 75 % der Zellen und in RPE-Aggregaten 80 % der Zellen neu synthetisiert werden. Prozesse des selektiven Zelltodes, die in der intakten Retina ab Tag E12 ablaufen (30), wurden bei diesen Experimenten nicht erfaßt. Es ist deshalb möglich, daß die Proliferationsrate in vitro bei noch höheren Werten liegt.

Nach der Dissoziation durchlaufen die Zellen für einen Tag eine Erholungsphase, in der, verglichen mit der intakten Retina, eine beträchtlich geringere Neusynthese von Zellen stattfindet. Nach den vorliegenden experimentellen Befunden liegt folgende Interpretation der Ergebnisse nahe: Bei R-Aggregaten ist der zeitliche Ablauf der Proliferation nicht verschoben, das heißt, daß die Zellen, die in der Erholungsphase der trypsinisierten Retinaeinzelzellen nicht gebildet wurden, auch nicht nachsynthetisiert werden. Da der zeitliche Ablauf der Proliferation retinaler Zellen in der Gegenwart von PE-Zellen um etwa 1 - 2 Tage verschoben ist, besteht die Möglichkeit, daß ein beträchtlicher Teil der, während der Erholungsphase nicht synthetisierten, Zellen in diesem Zeitraum nachsynthetisiert wird. Quantitativ werden in den RPE-Aggregaten 20 % mehr Zellen im selben Zeitraum synthetisiert.

Offen bleibt die Frage, wie der Effekt der Stimulierung oder der Aufrechterhaltung der Proliferation retinaler Zellen durch das PE vermittelt wird. Die Vermittlung dieses Effektes durch einen löslichen Faktor ist nicht wahrscheinlich. Denn werden PE-Zellen in ein 0,5 %iges Agargel eingegossen, das eine Diffusion eines löslichen Faktors erlaubt, und retinale Zellen auf diesem Gel geschüttelt, entstehen Aggregate, die dieselbe Anordnung von Schichten besitzen wie R-Aggregate.

Im Zusammenhang mit der verlängerten Proliferation retinaler Zellen in RPE-Aggregaten ist die Fähigkeit des PE in Betracht zu ziehen, unter gewissen Bedingungen selbst eine neue Retina oder wenigstens Retinazellen zu regenerieren. Säuger und Vögel ver-

lieren diese Fähigkeit früh während ihrer embryonalen Entwicklung, Amphibien verlieren sie nach der Metamorphose, und einige Urodelen behalten sie über ihr ganzes Leben. Fische besitzen ebenfalls die Fähigkeit zur Regeneration der Retina. Jedoch fanden Maier und Wolburg (48) keine Transformation des PE-Gewebes bei Goldfischen. Die Retina regenerierte aus der Wachstumszone der Retina. Embryonal haben Retina- und PE-Gewebe denselben Ursprung. Erst nach der Einstülpung des Sehventrikels zum Augenbecher entstehen zwei Wandplatten. Die innere, dickere differenziert sich zur Neuroretina, die äußere, dünnere zum PE. Diese Differenzierung, insbesondere die zum PE, scheint in verschiedenen Vertebraten verschieden stabil zu sein. Detwiler et al. (12,13) induzierten in vitro aus dem PE in einer Sandwichtechnik (mit einem Stück Retina als Induktor) retinales Gewebe aus dem PE von Amblystoma punctatum. Keefe (37,38,39) gelang es, die Retinae einiger Urodelen komplett zu regenerieren, nachdem er entweder nach dem Durchtrennen des optischen Nervs und der damit verbundenen Degeneration der Retina oder nach der operativen Entfernung der Retina eine regenerierte Retina erhielt. Für die regenerierte Retina fand er zwei Quellen von Zellen. Der linsennahe Teil der Retina regenerierte aus der Pars Ciliaris Retina, der zentrale Teil der neuen Retina regenerierte aus dem PE. Cronly-Dillon (10) zeigte auf elektrophysiologischem Wege, daß diese regenerierte Retina eine funktionierende, korrekte retino/ tektale Projektion macht.

Auch bei Hühnchenembryos ist die Regeneration der Retina möglich, allerdings nur eingeschränkt. Coulombre et al. (8) zeigten, daß die Regeneration der Hühnchenretina bis Stadium 24

(nach Hamburger und Hamilton (26)), das einer E4 Retina entspricht, nach deren operativen Entfernung möglich ist. Allerdings müssen zur Regeneration der Retina ein kleines Stück der Retina oder des Utrikels des Ohres als Induktor reimplantiert werden. Diese Induktion einer, aus dem PE regenerierenden, Retina wird auch durch ein kleines Stück Mäuseretina hervorgerufen (9). Die Hauptquelle für die Zellen des Regenerates ist bei Hühnchen das PE. Einen kleineren Beitrag steuert die Pars Ciliaris Retina bei.

Drei Beobachtungen sprechen jedoch dagegen, daß in Aggregaten mit PE retinale Zellen aus dem PE gebildet wurden: Coulombre (8) fand bei Retinae intakter Hühnchenembryos Regeneration der Retina aus dem PE nur bis zum Stadium 24 nach Hamburger und Hamilton (26), also etwa bis E4, während die Aggregationsexperimente mit E6 Retinagewebe angesetzt wurden. Weiterhin spricht gegen Regeneration retinaler Zellen aus dem PE, daß der PE-Anteil nach 2 - 3 Tagen in Kultur in der überwiegenden Anzahl der Aggregate aus dem Aggregat ausgeschleust wird; zu diesem Zeitpunkt findet die erhöhte Proliferation aber noch statt. Weiterhin konnte in RPE-Schüttelaggregaten keine Depigmentierung des PE gezeigt werden. Andererseits ist embryonales PE in vielen Arten von Vertebraten bezüglich der endgültigen Determinierung seiner Differenzierung ein sehr labiles Gewebe. Da zusätzlich in Aggregaten, deren PE-Anteil an der Oberfläche des Aggregates assoziiert blieb, eine erhöhte Proliferation in direkter Nachbarschaft zum PE gefunden wurde, ist nicht auszuschliesen, daß ein kleiner Anteil Zellen auf dem Wege der Regeneration retinaler Zellen aus dem PE entstanden ist.

Eine Möglichkeit des Einflußes von PE auf Retinazellen besteht in einer direkten Zell/Zellwechselwirkung. PE-Zellen reaggregieren sehr schnell. Um diese PE-Klumpen ordnen sich nach ein bis zwei Tagen retinale Zellen in einer rosettenartigen Struktur an. Diese frühe Ausbildung einer räumlichen Ordnung könnte als "Orientierungshilfe" für weitere Retinazellen dienen. Die frühe Ordnung im Aggregat ermöglicht, daß die Zellen räumlich geordneter aus der Proliferation ausscheiden. Die Steuerung der Proliferation und Determinierung von Subpopulationen retinaler Zellen durch das PE sind über direkte Membrankontakte, sowie durch Kommunikation über "gap junctions" denkbar. Der zeitliche Verlauf des Auftretens von gap junctions zwischen Retina- und PE-Zellen ist mit dieser Annahme vereinbar. Hayes (28) fand für das Auftreten von gap junctions zwischen den beiden Geweben einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie Fujisawa et al. (20) für das Auftreten von gap junctions zwischen retinalen Zellen. Nur wenige gap junctions werden zwischen Retina und PE zu E3 gefunden, es erfolgt ein beträchtliches Ansteigen der Anzahl von gap junctions bis E5, mit einem Maximum bei E7 und einem signifikanten Abfall der Anzahl bis E9. Keine "gap junctions" zwischen Retina und PE können bei E14 nachgewiesen werden. Diese gap junctions treten immer zwischen proliferierenden, aber nicht in der Teilung befindlichen, Zellen und PE-Zellen, nie aber zwischen Photorezeptoren oder Photorezeptorvorläufern und PE oder sich gerade teilenden Zellen und PE-Zellen, auf (28); das heißt, daß das PE über gap junctions Einfluß auf retinale Zellen ausüben könnte.

Das PE kann auch induktive Einflüsse auf benachbartes Gewebe ausüben. Zwar wurden bisher nie induktive Einflüsse des PE auf retinales Gewebe gezeigt, aber es wurden Experimente beschrieben, die die Induktion von Knorpel aus periokulärem Mesenchym durch PE bei Hühnchen in vitro mit einer Sandwichtechnik zeigten (53). Es ist nicht auszuschließen, daß PE auf die Neuroretina ähnliche induktive Effekte ausübt, so daß auf diese Weise die Stimulierung oder die Aufrechterhaltung der erhöhten Proliferationsrate induziert werden, oder Positionsinformation auf Subpopulationen retinaler Zellen übertragen werden.

Einen Beitrag zur Anlage einer Schichtenstruktur während des frühen Aggregationsvorganges könnte die spezifische Erkennung von Photorezeptorzellen, bzw. deren Außensegmente, durch das PE leisten. Dieses spezifische Erkennen von Photorezeptoren, bzw. deren Außensegmente, durch das PE werden von Hollifield et al. (29) und Mayerson et al. (49) beschrieben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bei der Reaggregation von E6 Retinazellen in Schüttelkultur der überwiegende Teil der Zellen erst während des Aggregationsvorganges neu gebildet wird. Die Reaggregation retinaler Zellen ist also nicht nur ein Aggregations-, Sortierungs- und Differenzierungsphänomen postmitotischer Zellen.

4.2.2. Prozesse, die zur Entstehung, Entwicklung und Differenzierung in Aggregaten aus E6 Retinazellen führen

Sheffield et al., Sheffield und Ben Shaul et al. (60,61,3) beschreiben die Entstehung der Primäraggregate einer rein retinalen Zellpopulation in Schüttelkultur (s.o.). Nach diesem etwa 24h dauernden Vorgang der Bildung von Primäraggregaten setzt die Beobachtung der Reaggregation dissoziierter retinaler Zellen in den oben beschriebenen Experimenten ein. Diese Beobachtungen zeigen, daß die Aggregation retinaler Zellen in Anwesenheit von PE nach 14 - 21 Tagen in Kultur eine viel besser geordnete Schichtstruktur im Aggregat ergibt und diese die umgekehrte Reihenfolge im Schichtenaufbau im Vergleich zu Aggregaten ohne PE zeigt. Diese Reihenfolge der Schichten wird schon sehr früh angelegt: Wie die Verteilung von $^{3}$H-Thymidin aufnehmenden Zellen zeigt, bildet eine Population postmitotischer Zellen bereits am ersten Tag der Aggregation mit dem PE-Klumpen den Kern des Aggregats und die proliferierenden Zellen den Randbereich, wobei am äußersten Rand der Aggregate einige AChE positive, also vermutlich differenzierte, Ganglienzellen gefunden werden.

Für die Beurteilung der Befunde ist zu beachten, daß sich die Gesamtzahl der Zellen im Verlauf der Aggregatentwicklung verfünffacht und dabei der Anteil postmitotischer Zellen von 30 % auf fast 100 % steigt, deren Anzahl sich also mindestens um den Faktor 18 erhöht: Die meisten Zellen im späteren Aggregat sind Produkte der ursprünglich vorhandenen proliferierenden Zellen. Andererseits ist bekannt, daß ein großer Teil der Ganglien- und Photorezeptorzellen in der Retina schon vor dem Tage 6 postmito-

tisch wird (35). Es ist denkbar, daß die geordnete Integration dieser postmitotischen Zelltypen im Aggregat für eine geordnete Entwicklung notwendig ist, daß es also nicht nur auf die geschichtete Anordnung der proliferierenden Zellen ankommt.

Die Befunde zeigen, daß der PE-Kern früh in der Entwicklung des Aggregats eine Schichtanordnung erzwingt, die von außen nach innen etwa der sich entwickelnden Retina in der Dimension der Ventrikularschicht zur Dimension der Schicht der postmitotischen Zellen entspricht; danach spielen sich die Prozesse der Proliferation, Determination und Schichtenbildung etwa so ab, wie diese entsprechend auch in der sich entwickelnden Retina geschehen. Diese lassen sich besonders in dem Auftreten und der Verstärkung der AChE gefärbten Schicht im Aggregat verfolgen, die dem Innenbereich der INL in der intakten Retina entspricht. Einen weiteren Hinweis dafür, daß Differenzierungsprozesse in der intakten Retina und in RPE-Aggregaten nach einem ähnlichen Muster ablaufen, liefern Ergebnisse, die mittels Autoradiographie an Schnitten von RPE-Aggregaten erzielt wurden. Nach der Etablierung der "Proliferationszone" im Aggregat nehmen die periphersten Zellen dieser Schicht kein tritiertes Thymidin mehr auf. Bei diesen Zellen handelt es sich vermutlich um Photorezeptoren oder deren Vorläufer. Die letzten Zellen, die sich in der Proliferationszone teilen, also nach Autoradiographie markiert sind, befinden sich unmittelbar außerhalb der AChE positiven Schicht, die sich etwa bis zur Mitte der INL des Aggregates erstreckt. Die letzten sich teilenden Zellen befinden sich also in einer Region, die charakteristisch für die Lage bipolarer Zellen ist. Kahn (35) beschreibt mit Thymidineinbaustudien in die intak-

te Retina, daß Photorezeptoren unmittelbar nach den Ganglienzellen, also sehr früh, aus dem mitotischen Zellzyklus auszuscheiden beginnen, während bipolare Zellen die letzten sind, die gebildet werden.

Eine schwierige Frage besteht darin, wie der PE-Kern diese frühe Sortierung lenkt, insbesondere welche Zelltypen er unmittelbar an sich anlagert und wie die Ausschleusung des PE-Kerns um den 2. - 3. Tag herum vor sich geht. In der intakten Retina liegt die Schicht proliferierender Zellen unmittelbar an die PE-Schicht an. Eine entsprechende Anordnung erwartet man zunächst auch für das Aggregat; aber die durch $^{3}$H-Thymidin Einbau erhaltenen Daten sprechen aber dagegen: Die dem PE- Kern benachbarten Zellen scheinen postmitotisch zu sein. Unter dieser Voraussetzung läge die Vermutung nahe, daß es sich bei den unmittelbar angelagerten Zellen um Ganglienzellen handelt, daß der Kern in reiner Form ausgeschleust wird und die geordnete GCL im Innern des Aggregats zurückläßt. Aber auch diese Interpretation ist vermutlich nicht richtig: Die am PE-Kern anliegenden Zellen sind immer AChE negativ, sind also keine Ganglienzellen und haben eine hohe räumliche Ordnung vergleichbar der einer Rosette in R-Aggregaten. In der Literatur werden die dem Lumen der Rosette benachbarten Zellen als Photorezeptoren oder deren Vorläufer (18) beschrieben. Diese Zellen kommen beim Ausschleusen des PE-Kerns an den Rand des Aggregats und werden am äußeren Rand des Aggregats deponiert. Vielleicht sind es in der Tat Photorezeptorzellen, die dann einen Teil der ONL des Aggregats bilden. Dieser hypothetische Mechanismus ist in der Abb. 24 skizziert: Nach dieser Vorstellung lagert der PE-Kern einen Teil der späteren ONL-Zel-

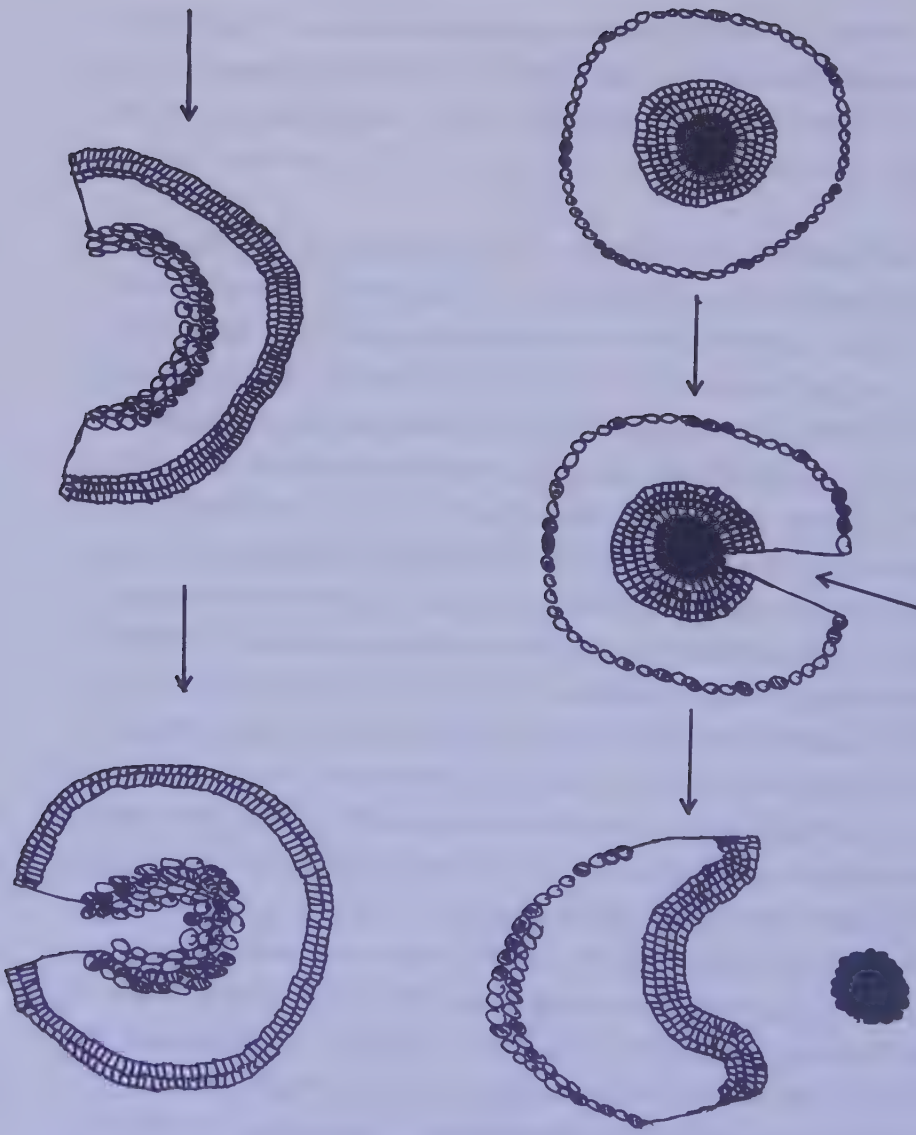



Abb. 24: Zeigt eine schematische Darstellung des vorgeschlagenen Mechanismus der Ausschleusung des PE-Kernes aus den RPE-Aggregaten.

len an, daran schließen sich weiter außen Schichten proliferierender Zellen an, die rosettenartig um das PE herum gelagert sind. Die Zellschicht um das PE ist oft 4 - 5 Zellen dick. In Rosetten in Aggregaten aus E6 Retinazellen ist die geordnete Struktur um das Lumen der Rosette in der Regel 2 Zellen dick. Nach zwei bis drei Tagen in Kultur beginnt das Aggregat von außen bis zum PE-Kern hin nekrotisch zu werden. Das PE wird ausgeschleust, die rosettenartige Zellschicht um das PE kommt an die Oberfläche des Aggregates und beginnt sich auszudehnen, um dabei die größtmögliche Oberfläche einzunehmen. Dies wird häufig bei den Aggregaten beobachtet, deren PE-Anteil an der Peripherie des Aggregates haften bleibt. Die Außenschicht überzieht nicht in jedem Fall das ganze Aggregat.

Der Vorgang des Ausschleusens des PE-Kernes scheint von einer teilweisen "Umstülpung" der Anordnung der Schichten im Aggregat begleitet zu sein. Durch diese Umstülpung gelangen die wenigen, sich zu Beginn der Reaggregation an der Peripherie des Aggregates befindlichen AChE, positiven Zellen, die als Ganglienzellen zu betrachten sind, ins Innere des Aggregates. Wie die GCL im Zentrum des Aggregates letztendlich aufgebaut wird, konnte mit den angewandten Methoden nicht bestimmt werden.

### 4.2.3. Vergleich der Histologie von Aggregaten nach 14 - 21 Tagen in Schüttelkultur

RPE-Aggregate besitzen bei der eingesetzten Zellmenge einen relativ einheitlichen Durchmesser zwischen 0,2 und 0,4 mm. In der Abwesenheit von PE entstehen aus den eingesetzten Retina-

zellen Aggregate mit Durchmessern bis zu 2,4 mm. Diese Riesenaggregate, die auch von Ishii (33) beschrieben werden, entstehen durch Fusion der Primäraggregate ab dem zweiten bis dritten Tag in Kultur. Zu diesem Zeitpunkt der Reaggregation unterscheiden sich die Zellen an der Oberfläche von RPE-Aggregaten bzw. R-Aggregaten nicht nur morphologisch, sondern auch biochemisch. Ohne PE-Zellen haben die Zellen an der Oberfläche der Aggregate sehr viel AChE exprimiert, während in RPE-Aggregaten AChE negative Zellen, also vermutlich Photorezeptoren, an der Oberfläche der Aggregate lokalisiert sind. Diese zeigen erst nach einer verlängerten Inkubation mit Butyrylthiocholinjodid als Substrat eine positive Cholinesterasereaktion. In diesem Unterschied der zellulären Komposition der Außenschicht liegen vermutlich die Konstanz der Größe der RPE-Aggregate und die Tendenz zur Fusion der R-Aggregate begründet.

Wie oben schon angedeutet, bewirkt die Sortierung der proliferierenden Zellen in den Außenbereich der Aggregate und die Ausschleusung des PE aus den RPE-Aggregaten eine Umkehrung der Reihenfolge der Schichten im Aggregat, verglichen mit der Polarität in R-Aggregaten. Diese umgekehrte Polarität wird während des gesamten Aggregationsvorganges beibehalten, so daß sich nach 14 - 21 Tagen in Kultur bei R-Aggregaten eine der GCL ähnliche Schicht an der Oberfläche des Aggregates befindet, während sie sich in RPE- Aggregaten im Zentrum des Aggregates befindet. Coulombre et al. (8) fanden nach der operativen Entfernung der Retina in E4 Hühnchen bei der Regeneration aus dem PE ebenfalls eine Umkehrung der Polarität der Schichtung. Das heißt, die Photorezeptorzellen des Regenerates zeigten zur Glaskörperhöhle und die

Ganglienzellen zum PE. Die umgekehrte Polarität der beiden Aggregattypen wird durch den PE-Anteil hervorgerufen. Die Zellen, die später einen Teil der äußersten Schicht der RPE-Aggregate bilden, werden zu Beginn der Aggregation mit einem sehr hohen Grad der Ordnung rosettenartig um das PE herum geschichtet. Setzt man voraus, daß die Zellen dieser Schicht das Bestreben besitzen, eine größtmögliche Oberfläche einzunehmen oder beträchtlich an Größe und damit an Volumen zunehmen, wie das für reifende Photorezeptoren zu erwarten wäre, würden sie einen Druck auf ihre Umgebung ausüben, durch den es zur Nekrose an einer Stelle des Aggregates kommt. Durch diese Öffnung des Aggregates und dem Ausschleusen des PE käme es zur Umkehrung der Polarität der Schichtung in diesen Aggregaten.

Abhängig vom Alter des retinalen Gewebes zu Beginn des Experiments werden ein grobes Aussortierungsverhalten der retinalen Zellen oder eine Anordnung der Zellen in vielen definierten Schichten beobachtet. Auch hierin unterscheiden sich die Serien von Experimenten in Gegenwart und Abwesenheit von PE. In Aggregaten ohne PE wird nur bei Kulturen mit E6 Retinazellen eine Schichtung beobachtet. Bei diesen R-Aggregaten werden die drei innersten Schichten der Retina von außen nach innen rekonstruiert. Im großen, inneren Bereich dieser Aggregate kann mit den angewandten Markern keine Schichtung nachgewiesen werden. Werden zu Beginn des Experimentes jüngere (E5) oder ältere (E7 - E10) Retinazellen benutzt, so wird mit den angewandten Markern nur ein grobes Aussortieren retinaler Zellen untereinander beobachtet. Daraus folgt, daß es für die Schichtenbildung in R-Aggregaten eine optimale Zusammensetzung noch proliferierender und

bereits differenzierter Zellen zu Beginn des Experimentes gibt und diese in etwa der zellulären Komposition einer E6 Retina entspricht. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam DeLong (11) bei der Reaggregation von dissoziiertem embryonalem Hippocampusgewebe der Maus. Nur Zellen aus Tieren nach 18,5 Tagen Tragezeit waren in der Lage, nach 7 - 9 Tagen in Schüttelkultur in Aggregaten Hippocampus ähnliche Strukturen auszubilden. Grover (25) fand lungenähnliche Strukturen in Aggregaten dissoziierter Hühnchenlunge nur, wenn er seine Experimente mit E11 - E12 Gewebe startete.

Anders ist die Situation in RPE-Aggregaten. Eine komplette Rekonstitution der Schichtung, entsprechend der einer E10 - E12 Retina, kann in Aggregaten aus E6 Zellen nach 14 - 21 Tagen in Kultur beobachtet werden. Ob die Ganglienzellen im Zentrum der Aggregate aus E6 Zellen in einer Schicht mit klaren Grenzen vorliegen, kann aus Gründen der Auflösung der angewandten Methoden nicht entschieden werden. Eine größere Anzahl hochgeordneter Aggregate als mit E6 wird mit E5 Retinazellen erreicht. Bei diesen Aggregaten ist die GCL als Schicht zu erkennen. Nur sehr wenige hochgeordnete Aggregate entstehen aus E7 Zellen (1,4 % der Aggregate) und keine aus E9 Retinazellen in Gegenwart von PE. Das PE übt sehr früh während der Aggregation einen ordnenden Einfluß auf proliferierende Zellen aus. Daraus folgt: Je mehr proliferierende Zellen zu Beginn des Aggregationsprozesses durch das PE eine hohe räumliche Ordnung erfahren, desto ausgeprägter und vollständiger ist die Anordnung in Schichten in den Aggregaten nach 14 - 21 Tagen in Kultur.

Bei großen R-Aggregaten ist ein großer Teil im Innern der Aggregate, bei RPE-Aggregaten der allerinnerste Bereich der Aggregate, mit den angewandten Markierungsprozeduren nicht definierbar. Bei der Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop ist erkennbar, daß der innere Bereich der großen R-Aggregate aus Zellen zusammengesetzt ist, während der kleine innere Kern der RPE-Aggregate keine Zellen beinhaltet. Im Innenbereich von RPE-Aggregaten und großen R-Aggregaten findet man häufig Färbung mit LY. Bei großen R-Aggregaten scheint dies auf die dichte Packung der Zellen im Innern des Aggregats zurückzuführen zu sein. In RPE-Aggregaten könnte der allerinnerste Kern aus linsenartigen Strukturen zusammengesetzt sein, denn dieser allerinnerste Kern besitzt keine zellulären Elemente und ist mit LY stark anfärbbar, ebenso wie die Linse in vivo (Layer, unveröffentlichte Beobachtungen). Außerdem zeigten Araki und Okada (58), daß dissoziierte retinale Zellen in stationärer Zellkultur zu Linsenmaterial transdifferenzieren können.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Durch die Kombination der spezifischen Färbemethoden mit der histochemischen AChE-Reaktion, dem Fluoreszenzfarbstoff LY und dem Lektin FITC-PNA, die in der intakten Hühnchenretina spezifisch Zell- oder Faserschichten färben, konnte in Aggregaten dissoziierter E5 - E6 Retinazellen, die in Gegenwart von PE-Zellen entstanden, eine Anordnung von Zell- und Faserschichten nachgewiesen werden, die der einer intakten E10 - E14 Retina entspricht. Dieser Befund zeigt die ausgeprägte Fähigkeit embryonaler retinaler Zellen, sich selbst zu organisieren und eine hohe räumliche Ordnung zu schaffen. Es wurde gezeigt, daß diese hochgeordneten Aggregate nicht nur durch Aussortierung retinaler Zellen entstehen, sondern daß 80 % der Zellen erst in der Kulturschale neu gebildet werden. Durch das PE wird in einem frühen Stadium des Aggregationsprozesses eine Aussortierung bereits differenzierter und proliferierender Zellen im Aggregat erzwungen. Diese frühe Ordnung im Aggregat zusammen mit dem geordneten Ausscheiden proliferierender Zellen aus der Mitose ermöglichen eine räumliche Organisation im Aggregat, die der einer intakten Retina entspricht. Zum Vergleich besitzen dissoziierte E6 Retinazellen in Abwesenheit von PE nur die Fähigkeit, die drei innersten retinalen Schichten GCL, IPL und INL bei der Reaggregation von außen nach innen im Aggregat zu rekonstruieren. Einige Parameter, die bei der Entwicklung einer vielschichtigen Struktur *in vitro* eine Rolle spielen, wie das Alter des Retinagewebes zu Beginn des Experiments, die Proliferation, die Differenzierung und die Fähigkeit zur Morphogenese *in vitro* wurden beschrieben und diskutiert.

Außerdem wurden Experimente zur Charakterisierung LY-gefärbter Zellen durchgeführt. Es zeigte sich, daß dieser Farbstoff in Abhängigkeit vom Stadium der Entwicklung des retinalen Gewebes unterschiedlich aufgenommen wird. In einer frühen Phase der Entwicklung (E6) konnte eine Population gefärbter Zellen nachgewiesen werden, die den Farbstoff 3h nach ihrer letzten Teilung aufnimmt, es konnte also eine Korrelation zur Zellzyklusphase der gefärbten Zelle hergestellt werden. In späteren Stadien der Entwicklung (ab E11) konnten Hinweise erhalten werden, daß es sich bei den gefärbten Zellen um amakrine und "displaced" amakrine Zellen der Retina handelt. Nach Isolierung der gefärbten Zellen mit FACS konnte gezeigt werden, daß eine Subpopulation dieser Zellen den Neurotransmitter GABA benutzt.

Die oben beschriebenen Aggregate sind ein relativ einfaches Modellsystem, um Mechanismen der Zelldifferenzierung, der Ausbildung einer räumlichen Organisation und der Musterbildung in einem neuronalen Gewebe in vitro zu untersuchen. So kann der Einfluß externer Gewebe wie PE auf die retinale Zelldifferenzierung untersucht werden. Ferner ist es möglich, die normale retinale Entwicklung in Aggregaten zu stören und die durch die Störung hervorgerufene Veränderung der Schichtstruktur zu untersuchen. Geeignete Mittel für derartige Experimente sind monoclonale Antikörper, die spezifisch gegen bestimmte Retinazelltypen gerichtet sind, das Faserwachstum inhibieren, das Binden von Zellen aneinander oder an Substrate beeinträchtigen. Auch mit retino- oder neurotoxischen Substanzen, wie Antagonisten von Neurotransmittern ist es möglich, den normalen Schichtaufbau in Aggregaten zu stören, wie entsprechende Vorversuche zeigten.

Den größten Vorteil jedoch bietet das System bei der Untersuchung des Schicksals spezifisch gewonnener Zellen. So können z.B. Zellen aus verschiedenen, definierten Bereichen der Retina, Zellpopulationen verschiedener Entwicklungsstadien oder Populationen bestimmter Zelltypen in beliebigen Mengen gemischt werden und ihre Beiträge zur Aggregation, Differenzierung und Ausbildung einer geordneten Schichtstruktur untersucht werden.

## 6. LITERATUR


1. Araki, M., and Okada, T.S.: Dev. Biol. 60, 278-286, 1977
2. Baughman, R.W., and Bader, C.R.: Brain Res. 138, 469-485, 1977
3. Ben Shaul, Y., and Moscona A.A.: Exptl. Cell Res. 95, 191-204, 1975
4. Bennett, M.V.L., Spira, M.E., and Spray, D.C.: Dev. Biol. 65, 114-125, 1978
5. Blanks, J.C., and Roffer-Tarbor, S.: Exp. Eye Res. 35, 573-584, 1982
6. Brandon, C., Lam, D.M.K., and Yang-Yen Wu: Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 76, 3557-3561, 1979
7. Casper, D.S., Trelstad, R.L., and Reif-Lehrer, L.: J. Comp. Neurol. 209, 79-90, 1982
8. Coulombre, J.L., and Coulombre, A.J.: Dev. Biol. 12, 79-92, 1965
9. Coulombre, J.L., and Coulombre, A.J.: Nature 228, 559-560, 1970
10. Cronly-Dillon, J.: J. Neurophysiol. 31, 410-418, 1968
11. DeLong, G.R.: Dev. Biol. 22, 563-583, 1970
12. Detwiler, S.R., and Van Dyke, R.H.: J. exp. Zool. 122, 367-384, 1953
13. Detwiler, S.R., and Van Dyke, R.H.: J. exp. Zool. 126, 135-160,1954
14. Dütting, D., Gierer, A., and Hansmann, G.: Dev. Brain Res. 10, 21-32, 1983
15. Dvorak, D.R., and Morgan, I.G.: Neuroscience Letters 36, 249-253, 1983

16. Ehrlich, D., and Morgan, I.G.: Neuroscience Letters 17, 43-48, 1980

17. Famiglietti jr., E.V., and Vaughn, J.E.: J. Comp. Neurol. 197, 129-139, 1983

18. Fujisawa, H.: Development, Growth and Differentiation 13, 25-36, 1971

19. Fujisawa, H.: Wilhelm Roux' Archiv 171, 312-330, 1973

20. Fujisawa, H., Morioka, H., Watanabe K., and Nakamura, H.: J. Cell Sci. 22, 585-596, 1976

21. Galtsoff, P.S.: J. exp. Zool. 42, 183-253, 1925

22. Garcia-Bellido, A.: Dev. Biol. 14, 278-306, 1966

23. Gierer, A., Berking, S., Bode, H., David, C.N., Flick, K., Hansmann, G., Schaller, H., and Trenkner, E.: Nature 239, 98-101, 1972

24. Giudice, G.: Dev. Biol. 5, 402-411, 1962

25. Grover, J.W.: Exp. Cell Res. 24, 171-173, 1961

26. Hamburger, V., and Hamilton, H.L.: J. Morphol. 88, 49-92, 1954

27. Hayden, S.A., Mills, J.W., and Masland, R.M.: Science 210, 435-437, 1980

28. Hayes, B.P.: Anat. Embryol. 151, 325-333, 1977

29. Hollifield, J.G., and Witkovski, P.: J. exp. Zool. 189, 357-378,1974

30. Hughes, W.F., and McLoon, S.C.: Exp. Neurol. 66, 581-601, 1979

31. Imperato, A., Prada, M.L., Morelli,M., Fossarello,M., and Di Chiara, G.: Brain Res. 213, 205-210, 1981

32. Ingham, C.A., and Morgan I.G.: Neuroscience 9, 165-181, 1983

33. Ishii, K.: Cytologia 31, 89-98, 1966

34. Jacobson, M.: Developmental Neurobiology, sec. ed., 27-49, 1978, Plenum Press, New York and London

35. Kahn, A.J.: Dev. Biol. 38, 30-40, 1974

36. Karnovski, M.J., and Roots, L.: J. Histochem. Cytochem. 12, 219-221, 1964

37. Keefe, J.R.: J. exp. Zool. 184, 185-206, 1973

38. Keefe, J.R.: J. exp. Zool. 184, 207-232, 1973

39. Keefe, J.R.: J. exp. Zool. 184, 239-258, 1973

40. Korr, H.: Techniques in Neuroanatomical Research, 218-244, 1981, Springer Verlag Heidelberg New York

41. Layer, P.G., and Vollmer, G.: Neuroscience Letters 31, 99-104, 1982

42. Layer, P.G., Vollmer, G., and Kotz, S.: Neuroscience Letters 35, 239-245, 1983

43. Layer, P.G. and Kotz, S.: Neuroscience 9, 931-941, 1983

44. Layer, P.G.: Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 80, 6413-6417, 1983

45. Linser, P., and Moscona, A.A.: Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 76, 6476-6480, 1979

46. Liu, L., Layer, P.G., and Gierer, A.: Dev. Brain Res. 8, 223-229, 1983

47. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951

48. Maier, W., and Wolburg, H.: Cell Tissue Res. 202, 99-118, 1979

49. Mayerson, P.L., and Hall, M.O.: J. Cell Biol. 97, 425, 1983

50. Moscona, A.A.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 92, 410-416, 1956

51. Moscona, M., Degenstein, L., Byun, K.Y., and Moscona, A.A.: Cell Differentiation 10, 317-327, 1981

52. Nagatsu, T., Levitt, M., and Udenfriend, S.: Analytical Biochemistry 9, 122-125, 1964

53. Newsome, D.A.: Dev. Biol. 27, 575-579, 1972

54. Oesch, B., and Birchmeier, W.: Cell 31, 671-679, 1982

55. Orr, M.F.: Dev. Biol. 17, 39-54, 1968

56. Osborne, N.N.: J. Neurochem. 36, 17-27, 1981

57. Pedersen, O.O., and Karlsen R.L.: Exp. Eye Res. 28, 569-575, 1979

58. Sarthy, P.V., and Lam, D.M.K.: Brain Res. 176, 208-212, 1979

59. Sarthy, P.V., Johnson, S.M., and Detwiler, P.B.: J. Comp. Neurol. 206, 371-378, 1982

60. Sheffield, J.B., and Moscona, A.A.: Exptl. Cell Res. 57, 462-466, 1969

61. Sheffield, J.B.: J. Morphology 132, 245-264, 1970

62. Sheffield, J.B., and Moscona, A.A.: Dev. Biol. 23, 36-61, 1970

63. Shen, S.C., Greenfield, P., and Boell, E.J.: J. Comp. Neurol. 106, 433-461, 1956

64. Stewart, W.W.: Cell 14, 741-759, 1978

65. Stewart, W.W.: Nature 292, 17-21, 1981

66. Turksen, K., Aubin, J.E., Sodek, J., and Kalnius, V.I.: J. Cell Biol. 97, 232, 1983

67. Weiss, P., and Taylor, A.C.: Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 46, 1177-1185, 1960

68. Wilson, H.V.: J. exp. Zool. 5, 245-258, 1907

69. Wilson, S.H., Schrier, B.K., Farber, J.L., Thompson, E.J., Rosenberg, R.N., Blume, A.J., and Nirenberg, M.W.: J. Biol. Chem. 247, 3159-3169, 1972

70. Yazulla, S.: J. Comp. Neurol. 200, 83-93, 1981

71. Yazulla, S., and Brecha, N.: Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 78, 643-647, 1981

72. Zürcher, G., and Da Prada, M.: J. Neurochem. 38, 191-195,

HOCHSCHULLEHRER

Meine akademischen Lehrer waren:

| | |
|---|---|
| Physiologische Chemie: | G. Weitzel, D. Mecke, K. Eisele |
| Organische Chemie: | E. Bayer, M. Hanack, W. Völter, W. Rundel, G. Jung |
| Anorganische Chemie: | E. Lindner, J. Strähle |
| Physikalische Chemie: | H. Mauser, W. Zeil |
| Analytische Chemie: | H. Krug |
| Peptidchemie: | K. Eisele |
| Physik. Biochemie: | W. Völter, A. Wendel |
| Molekularbiologie: | H. Probst |
| Klin. Biochemie: | A. Wendel |
| Anatomie: | K. Mörike |
| Pharmakologie: | H. Remmer |
| Physiologie: | E. Betz |
| Mikrobiologie: | V. Braun, H. Zähner |
| Genetik: | W. Seyffert |
| Botanik: | H. Metzner |
| Zoologie: | K. G. Grell |
| Pflanzenphysiologie: | H. Ninnemann, H. Metzner |
| Physik: | F. Gönnenwein, H. Krüger |
| Mathematik: | H. Pommer |
| Strahlenkunde: | E. Kallee, U. Feine |
| Neuro- und Entwicklungsbiologie: | A. Gierer, F. Bonhöffer, U. Schwarz |

LEBENSLAUF

| | |
|---|---|
| Geboren am | 22. März 1954 |
| in | Tailfingen |
| Eltern | Walter und Margret Vollmer geb. Bayh |

Ausbildung

| | |
|---|---|
| 1961 - 1965 | Volksschule Tailfingen |
| 1965 - 1973 | Mathem. - Naturwissensch. Gymnasium Ebingen |
| 19. Juni 1973 | Abitur |
| Oktober 1973 - September 1975 | Bundeswehr |
| WS 75/76 - WS 83/84 | Studium der Physiologischen Chemie und Biochemie an der Universität Tübingen |
| 19. Oktober 1976 | Vordiplom 1. Teil |
| 31. März 1978 | Vordiplom 2. Teil |
| Mai 1980 | Diplomhauptprüfung |
| Juni 1980 - März 1981 | Diplomarbeit am Physiologisch - Chemischen Institut der Universität Tübingen |
| 27. März 1981 | Diplom |
| April 1981 - April 1984 | Dissertation "Biochemische und zellbiologische Untersuchungen zur Differenzierung und Schichtenbildung in der embryonalen Hühnchenretina" unter Anleitung von Prof. Dr. A. Gierer am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen. |